



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลผลิตมวลชีวภาพและไขมันจากสาหร่ายน้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้
สภาวะการเติบโตแตกต่างกัน

Biomass and Lipid Production of Marine Microalgae
under Different Growth Conditions

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุดะโค

นางสาวปวีณา ตปนีย์วรวงค์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลิ ไพบุลย์กิจกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รชนิมุข หิรัญส์จจาเลิศ

หัวหน้าโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 181801
เลขที่สัญญา 42/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลผลิตมวลชีวภาพและไขมันจากสาหร่ายน้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้
สภาวะการเติบโตแตกต่างกัน

Biomass and Lipid Production of Marine Microalgae
under Different Growth Conditions

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค
นางสาวปวีณา ตปนีย์วรวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลิ ไพบุลย์กิจกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ

หัวหน้าโครงการ
ผู้ร่วมโครงการ
ผู้ร่วมโครงการ
ผู้ร่วมโครงการ

คณะเทคโนโลยีทางทะเล
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติเลขที่สัญญา 42/2559

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ที่เอื้อเพื่อให้ใช้สถานที่ในการทดลอง พร้อมทั้งเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล ที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติการทดลอง รวมถึงนางณิชา สิรินนธ์ธนา และ ดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ นักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยให้คำปรึกษาการสกัดไขมัน และตรวจวัดปริมาณไขมัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค
สิงหาคม 2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้แยกสาหร่ายจากบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติที่ตั้งอยู่ในจังหวัดจันทบุรี พบว่าในบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มสามารถแยกได้ 5 ชนิด คือ ไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 และสาหร่าย Unknown BUUC1503 สาหร่าย Unknown BUUC1504 และสาหร่าย *Spirulina* BUUC1505 ส่วนในแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติสามารถแยกสาหร่ายได้ 2 ชนิด คือ สาหร่าย *Chlorella* BUUC1601 และไดอะตอม *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602)

เมื่อนำสาหร่ายที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหาร F/2 ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ (ความเค็ม 30 พีพีที) พบว่าสาหร่าย Unknown BUUC1503, Unknown BUUC1504 และสาหร่าย *Spirulina* BUUC1505 เติบโตได้ดี แต่พบว่าสาหร่ายมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและสาหร่ายชนิดอื่น ส่วนไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, *Chlorella* BUUC1601 และ *A. coffeaeformis* (BUUC1602) มีความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อน และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.55, 0.47, 1.22 และ 2.46 ต่อวัน ตามลำดับ โดยมีผลผลิตมวลชีวภาพ 71.04×10^7 , 62.76×10^7 , $1,089 \times 10^7$ และ 87.33×10^7 เซลล์/ลิตร/วัน ตามลำดับ

ไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, สาหร่าย *Chlorella* BUUC1601 และ *A. coffeaeformis* มีกรดไขมันพาล์มิติก (C16:0), พาล์มิตอเลอิก (C16:1), สเตียริก (C18:0) และ โอเลอิก (C18:1n9) ส่วนกรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2n6) และสเตียริโดนิก (C18:4n3) พบใน *Chlorella* BUUC1601 และ *A. coffeaeformis* เท่านั้น ในขณะที่ กรดไขมันอีโคซะเพนเตอีนอิก (C20:5n3) พบเฉพาะในไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 (10.52% ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด) และ *A. coffeaeformis* (BUUC1602) (8.26% ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด)

ABSTRACT

In this study, microalgae were isolated from aquaculture pond and natural seawater in Chanthaburi Province. Five species of microalgae i.e. *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, Unknown BUUC1503, Unknown BUUC1504 and *Spirulina* BUUC1505 were isolated from aquaculture pond. A green alga *Chlorella* BUUC1601 and diatom *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602) were isolated from natural seawater.

Cultures of microalgae were conducted under laboratory condition. Microalgae grown in F/2 medium that prepared from natural seawater (30 ppt). It was found that growth of Unknown BUUC1503, Unknown BUUC1504 and *Spirulina* BUUC1505 was quite good. However, those of microalgae were contaminated with bacteria and another species of microalgae. Pure cultures of *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, *Chlorella* BUUC1601 and *A. coffeaeformis* (BUUC1602) were also performed. Their specific growth rate and biomass productivity were 0.55, 0.47, 1.22 and 2.46 day⁻¹ and 71.04 x10⁷, 62.76 x10⁷, 1,089 x10⁷ and 87.33x10⁷ cells/L/day, respectively.

Some fatty acids such as palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0) and oleic acid (C18:1) were found in *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, *Chlorella* BUUC1601 and *A. coffeaeformis*. While, linoleic acid (C18:2n6) stearidonic acid (C18:4n3) was found in *Chlorella* BUUC1601 and *A. coffeaeformis*. Eicosapentaenoic acid (C20:5n3) was found in *Nitzschia* BUUC1501 (10.52% in TFA) and *A. coffeaeformis* (BUUC1602) (8.26% in TFA).

สารบัญเรื่อง

| | หน้า |
|--|------|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| บทคัดย่อ | ข |
| ABSTRACT | ค |
| สารบัญเรื่อง | ง |
| สารบัญตาราง | จ |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| บทนำ | 1 |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย | 2 |
| วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 3 |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย | 3 |
| ทฤษฎีและแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย | 3 |
| งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 7 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 9 |
| เนื้อหา | 10 |
| วิธีการดำเนินการวิจัย | 11 |
| ผลการทดลอง | 14 |
| อภิปรายผล | 36 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 42 |
| สรุปผลการทดลอง | 43 |
| ข้อเสนอแนะ | 43 |
| แนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ | 44 |
| ผลผลิต (Output) | 45 |
| รายงานสรุปการเงิน | 47 |
| เอกสารอ้างอิง | 48 |
| ภาคผนวก | 52 |
| ประวัตินักวิจัยพร้อมหน่วยงาน | 73 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|--|------|
| 1.1 ชนิดและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด) | 4 |
| 1.2 การจำแนกสิ่งมีชีวิตตามแหล่งอาหารและพลังงาน | 5 |
| 2.1 คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ทำการแยกสาหร่ายขนาดเล็ก | 14 |
| 2.2 ลักษณะของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ | 16 |
| 2.3 คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติที่ทำการแยกสาหร่ายขนาดเล็ก | 21 |
| 2.4 ลักษณะของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ | 22 |
| 2.5 การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ต่างชนิดกัน | 28 |
| 2.6 การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ บริเวณจังหวัดจันทบุรี | 30 |
| 2.7 ปริมาณน้ำหนักรวมและผลผลิตของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณจังหวัดจันทบุรี และนำมาเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ | 31 |
| 2.8 เปอร์เซ็นต์ไขมันในน้ำหนักรวมของสาหร่ายที่แยกจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติและบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ | 32 |
| 2.9 องค์ประกอบกรดไขมันที่พบในสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ | 35 |
| 3.1 ปริมาณไขมัน (%ในน้ำหนักรวม) ของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ | 41 |
| 3.2 เปอร์เซ็นต์ EPA (ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด) ในไดอะตอม <i>Nitzschia</i> BUUC1501 และ <i>A. cofferaeformis</i> | 41 |

สารบัญญภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| 1.1 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ | 4 |
| 2.1 การบ่มน้ำตัวอย่างในห้องที่มีอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และเติมอากาศตลอดเวลา 4 วันโดยเป็นน้ำตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง (ก) น้ำตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงปู และ (ข) น้ำตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงปลากระพงขาว (ค) | 15 |
| 2.2 ลักษณะการเติบโตของสาหร่ายที่แยกได้ (ก) โดยเติบโตบนอาหารวุ้น และอาหารเหลว (ข) | 16 |
| 2.3 ลักษณะของสาหร่าย <i>Nitzschia</i> BUUC1501 ภายใต้กล้อง light microscope (ก) และ scanning electron microscope (ข) ในบ่อพักน้ำที่มีความเป็นกรด (pH 2.88) ของฟาร์มเลี้ยงกุ้งสินิกรมย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี | 18 |
| 2.4 ลักษณะของสาหร่าย <i>Amphora</i> BUUC1502 (ก-ข) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown SP1503 (ค) ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งของสินิกรมย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี ที่น้ำในบ่อที่มีค่าอัลคาไลน์สูงถึง 136 ± 0.00 มิลลิกรัม/ลิตร | 19 |
| 2.5 ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown BUUC1504 (ก-ข) ที่แยกจากบ่อเลี้ยงปูทะเลแบบธรรมชาติ ในตำบลสีพยา อำเภอกำแพง จังหวัดจันทบุรี | 19 |
| 2.6 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน <i>Spirulina</i> สายพันธุ์ BUUC1505 (ก-ข) แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลากระพงขาว ในอำเภอกำแพง จังหวัดจันทบุรี | 20 |
| 2.7 การเติบโตของสาหร่าย <i>Nitzschia</i> sp. BUUC1501 ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว และนำมาเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ด้วยอาหาร F/2 เป็นเวลา 8 วัน | 24 |
| 2.8 การเติบโตของสาหร่าย <i>Amphora</i> sp. BUUC1502 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาว เป็นไดอะตอม และนำมาเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ด้วยอาหาร F/2 เป็นเวลา 9 วัน | 25 |
| 2.9 การเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown SP1503 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาว แล้วนำมาเลี้ยงในปฏิบัติการ ด้วยอาหาร F/2 เป็นเวลา 12 วัน | 25 |
| 2.10 การเติบโตของสาหร่าย Unknown BUUC1504 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปูทะเลเป็นสาหร่ายสีเขียว | 26 |
| 2.11 การเติบโตของสาหร่าย <i>Spirulina</i> sp. BUUC1505 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปลากระพงขาว ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและเซลล์บิดเป็นเกลียว | 27 |
| 2.12 การเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> BUUC1601 ที่แยกจากบริเวณสะพานท่าเรือประมงอ่าวหมู อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดจันทบุรี | 29 |
| 2.13 การเติบโตของไดอะตอม <i>Amphora coffeaeformis</i> ที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ คลองปากน้ำ จังหวัดจันทบุรี | 29 |
| 2.14 โคโรมาโตแกรมของกรดไขมันจากไดอะตอม <i>Nitzschia</i> BUUC1501 | 32 |
| 2.15 โคโรมาโตแกรมของกรดไขมันจากไดอะตอม <i>Amphora</i> BUUC1502 | 33 |
| 2.16 โคโรมาโตแกรมของกรดไขมันจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> BUUC1601 | 33 |

2.17 โครมาโตแกรมของกรดไขมันจากไดอะตอม *Amphora coffeaeformis*
(BUUC1602)

34

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จุลสาหร่ายหรือสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เป็นพืชที่สามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชชนิดอื่น ซึ่งทำให้สาหร่ายมีข้อได้เปรียบกว่าพืชชั้นสูงชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในกลุ่มของสาหร่ายน้ำเค็มซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และเซลล์ยังอุดมไปด้วยสารประกอบทางชีวเคมีหรือสารเมแทบอลิต์ที่มีคุณค่า เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน รงควัตถุและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายมีศักยภาพที่สามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ได้ดี อย่างไรก็ตาม สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารดังกล่าวข้างต้นได้แตกต่างกัน ทั้งในรูปของชนิดและปริมาณของสารเมแทบอลิต์ ถึงแม้ว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเป็นก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas) ส่งผลให้เกิดสภาวะโลกร้อน แต่ก๊าซชนิดจะถูกดักจับให้ลดลงได้โดยพืช ซึ่งนำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง พืชชั้นสูงและรวมถึงสาหร่ายจึงสามารถใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ร่วมกับน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างมวลชีวภาพ แต่สาหร่ายสามารถเติบโตได้ในน้ำและแบ่งตัวเป็น 2 เท่า จึงสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และยังใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชชั้นสูง ด้วยสาเหตุนี้ จึงมีการผลิตมวลชีวภาพของสาหร่ายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

ในปัจจุบันมีความต้องการมวลชีวภาพของสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมวลชีวภาพจากสาหร่ายมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในรูปต่างๆ โดยเฉพาะการเป็นแหล่งไขมันและกรดไขมันต่างๆ เพราะมีข้อได้เปรียบกว่าพืชชั้นสูงดังที่กล่าวไว้ในข้างต้น ซึ่งได้มีการรายงานว่า มีการคัดเลือกสาหร่ายมากกว่า 100 สายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ผลิตไขมัน (Sheehan *et al.*, 1998) รวมทั้งได้มีการกระตุ้นสาหร่ายให้เพิ่มปริมาณการสะสมไขมันด้วยวิธีการต่างๆ ทั้งการเปลี่ยนสภาวะการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของสารอาหาร เช่น การเลี้ยงภายใต้สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic growth) ในที่มืดและใช้สารอินทรีย์คาร์บอนแทนแหล่งพลังงาน หรือการเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงในปริมาณความเข้มข้นเพื่อกระตุ้นการสร้างรงควัตถุ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ หรือการแปรผันปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนและเหล็ก เป็นต้น (Xu *et al.*, 2006; Widjaja *et al.*, 2009; Yoo *et al.*, 2010) แต่ในความเป็นจริงแล้ว จากลักษณะทางภูมิประเทศของประเทศไทยที่อยู่ในเขตร้อน จึงมีแสงแดดตลอดทั้งปี ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย ซึ่งชนิดของสาหร่ายจะมีความแตกต่างกันตามสภาวะภูมิอากาศและภูมิประเทศ ซึ่งประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายสูง โดยมีความเป็นไปได้ที่จะนำสาหร่ายน้ำเค็มเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี มีพื้นที่อยู่ใกล้กับทะเล จึงมีทั้งแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติและยังมีพื้นที่สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้

ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้แยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำที่มีเค็ม (ความเค็มตั้งแต่ 5-35 PSU) ทั้งแหล่งน้ำธรรมชาติและบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ภายในจังหวัดจันทบุรี และจำแนกชนิดของสาหร่าย จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีไขมันสะสมในเซลล์ปริมาณสูงเพื่อนำไปกระตุ้นในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้สาหร่ายสะสมไขมันในปริมาณที่สูงกว่าสภาวะปกติ โดยองค์ความรู้ี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซล หรือสารประกอบทางชีวเคมีอื่นๆ รวมถึงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมได้ต่อไปในอนาคต รวมทั้งข้อมูลของกรดไขมันที่ได้ในสาหร่ายที่แยกจากแหล่งน้ำเค็มแต่ละชนิดจะใช้ในการจำแนกชนิดของสาหร่ายได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เก็บรวบรวมสาหร่ายจากแหล่งน้ำที่มีความเค็มและเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการเพื่อผลิตมวลชีวภาพและผลิตไขมัน

1.2.2 คัดเลือกสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตมวลชีวภาพและไขมัน

1.2.3 ศึกษาผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ได้แยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำ 2 รูปแบบ คือ (1) บริเวณชายฝั่งทะเล และ (2) บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ที่มีความเค็มในช่วง 5-35 ppt) ในจังหวัดจันทบุรี มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำสาหร่ายที่แยกได้มาศึกษาลักษณะการเติบโตและปริมาณไขมันและกรดไขมัน รวมทั้งจัดจำแนกชนิดสาหร่าย (ซึ่งสามารถเก็บรวบรวมสาหร่ายที่แยกได้และเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการไว้เป็นหัวข้อในการศึกษาด้านอื่นๆ ต่อไป) คัดเลือกสาหร่ายที่ให้ผลผลิตมวลชีวภาพและผลผลิตไขมันสูงอย่างน้อย 2 ชนิด ตามลำดับ มาเพาะเลี้ยงในสภาวะการเติบโต 3 รูปแบบ คือ (1) โฟโตออโตโทรฟิก (2) มิกโซโทรฟิก และ (3) เฮเทอโรโทรฟิกเพื่อวิเคราะห์ผลผลิตมวลชีวภาพและไขมัน รวมทั้งองค์ประกอบกรดไขมัน

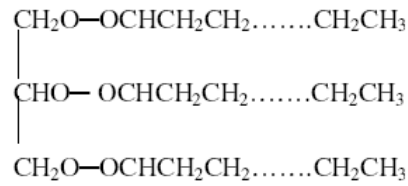
1.4 ทฤษฎีและแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

1.4.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวกับสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์มีความซับซ้อนที่แตกต่างกัน มักพบในที่ชื้นหรือแหล่งน้ำ และบนพื้นดิน ตลอดจนสภาพแวดล้อมทางน้ำ เช่นเดียวกับพืช ชั้นสูง และที่สำคัญสาหร่ายต้องใช้ออกซิเจนประกอบหลักสำหรับสร้างมวลชีวภาพ คือ แสงแดด ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยใช้กระบวนการการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยทั่วไปสาหร่ายจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ จุลสาหร่ายหรือสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) และสาหร่ายขนาดใหญ่ (macroalgae) โดยที่สาหร่ายขนาดใหญ่มีหลายเซลล์

1.4.2 ไขมันในสาหร่าย

ไขมัน (lipid) ชนิดของไขมันภายในเซลล์สาหร่ายมีความคล้ายคลึงกับพืชชั้นสูง ไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) (รูปที่ 1.1) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) เลซิธิน (lecithin) ฟอสโฟติดีลกลีเซอรอล (phosphatidyl glycerol) และฟอสโฟติดีลอินซิทอล (phosphatidyl inositol) กรดไขมันที่พบในสาหร่ายส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่มีคาร์บอนจำนวน 14 16 และ 20 อะตอม เป็นองค์ประกอบ การสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดกรดลิโนเลนิก (linolenic acid, C18:3) ของสาหร่ายมีปริมาณน้อยมาก ในขณะที่พืชชั้นสูงพบกรดลิโนเลนิกเป็นองค์ประกอบหลักเพราะกรดไขมันชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของคลอโรพลาสต์ ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในสาหร่ายบางชนิดแสดงดังตารางที่ 1.1 โดยชนิดของกรดไขมันที่พบในสาหร่ายจะขึ้นกับชนิดของสาหร่ายและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์

ตารางที่ 1.1 ชนิดและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)

| ชนิดของกรดไขมัน (จำนวนคาร์บอนอะตอม: จำนวนพันธะคู่) | ชนิดของสาหร่าย | | | | |
|--|---|---|-------------------------------------|--|--|
| | <i>Navicula elliculosa</i> ¹ | <i>Cylindrothec a gracilis</i> ² | <i>Nitzschia palea</i> ³ | <i>Skeletonema costatum</i> ⁴ | <i>Thalassiosira fluviatili</i> ⁵ |
| กรดไมริสติก (myristic acid, 14:0) | 2.8 | 7.0 | 6.2 | 6.2 | 7.9 |
| กรดปาล์มมิติก (palmitic acid, 16:0) | 9.1 | 16.4 | 22.8 | 11.1 | 23.2 |
| กรดปาล์มมิตอเลอิก (palmitoleic acid, 16:1) | 30.8 | 21.3 | 44.7 | 21.7 | 44.8 |
| กรดเฮกซะเดคาไดอีนอิก (hexadecadienoic acid, 16:2) | 7.4 | 4.2 | 3.6 | 6.1 | 2.8 |
| กรดเฮกซะเดคาไตรอีนอิก (hexadecatrienoic acid, 16:3) | 18.3 | - | 1.6 | 11.4 | 6.5 |
| กรดสเตียริก (stearic acid, 18:0) | - | 1.0 | - | - | 0.3 |
| กรดโอเลอิก (oleic acid, 18:1) | 6.2 | 5.3 | 2.5 | 1.8 | 0.4 |
| กรดลิโนเลอิก (linoleic acid, 18:2) | 3.9 | 2.9 | - | 2.1 | 0.5 |
| กรดลิโนเลนิก (linolenic acid, 18:3) | 2.6 | - | - | - | 0.2 |
| กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid, 20:4) | 4.5 | 6.2 | 6.3 | 3.9 | 0.6 |
| กรดอีโคซะเพนเตอีนอิก (eicosapentaenoic acid, 20:5) | 14.5 | 24.4 | 12.0 | 30.2 | 8.0 |

ที่มา: ¹Kates and Volcani (1966); ²de Mort *et al.* (1972); ³Opute (1974); ⁴Chuecas and Riley (1969); ⁵Tornabene *et al.* (1974)

1.4.3 สถานะการเติบโตของสาหร่าย

แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่สิ่งมีชีวิตนำมาใช้ในการดำรงชีวิตสามารถใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ พวกที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานจัดเป็นพวกโฟโตโทรฟ (phototroph) ส่วนพวกที่ใช้สารอาหารที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายเป็นแหล่งพลังงานจัดเป็นเคโมโทรฟ (chemotroph) สิ่งมีชีวิตที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์จะเป็นพวกเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) แต่ถ้าใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนจัดเป็นพวกออโตโทรฟ (autotroph) ซึ่งสามารถสรุปการจำแนกสิ่งมีชีวิตตามการใช้แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 การจำแนกสิ่งมีชีวิตตามแหล่งอาหารและพลังงาน (สาโรจน์ และ ประวิทย์, 2538)

| แหล่งคาร์บอน | แหล่งพลังงาน | |
|----------------------|---|---|
| | เคมี | แสง |
| สารประกอบอินทรีย์ | เคโมเฮเทอโรโทรฟ - สัตว์ชั้นสูง - โปรโตซัว - เห็ดรา - แบคทีเรีย | โฟโตเฮเทอโรโทรฟ - แบคทีเรียบางชนิด - สาหร่าย |
| ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ | เคโมออโตโทรฟ - แบคทีเรียบางชนิด | โฟโตออโตโทรฟ - พืชชั้นสูง - สาหร่าย - ไฮยาโนแบคทีเรีย - แบคทีเรียบางชนิด |

(1) สถานะการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิค (photoautotrophic growth)

เป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้แหล่งพลังงานจากดวงอาทิตย์ การเพาะเลี้ยงแบบนี้มีข้อดีคือไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเรื่องแหล่งพลังงานแสงเพราะใช้แสงจากดวงอาทิตย์ แต่การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดกลางแจ้งมีข้อเสียคือเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (สาหร่ายชนิดอื่น โปรโตซัวและแบคทีเรีย) ปัญหาที่เกิดขึ้นสามารถแก้ไขได้ โดยต้องเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดที่สามารถทนต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมได้เช่น สาหร่าย *Dunaliella salina* ทนต่อความเครียดเนื่องจากความเค็มสูง สาหร่าย *Spirulina* sp. สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงได้ การเติบโตของสาหร่ายในการเพาะเลี้ยงแบบเปิดมักแปรผันตามฤดูกาล ซึ่งแต่ละฤดูจะมีความเข้มแสงและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป จึงเป็นการยากที่จะควบคุมให้สภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย อย่างไรก็ตามในประเทศไทย จีน เม็กซิโกและสหรัฐอเมริกา ยังมีการผลิตสาหร่าย *Spirulina* sp. เพื่อการค้าโดยทำการเพาะเลี้ยงในระบบเปิดกลางแจ้ง (Metting, 1996; Li and Qi, 1997) ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบโฟโตออโตโทรฟิคในระบบปิด (close system) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ทำการพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในระบบเปิด การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดทำได้โดยเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (photobioreactor) ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย

ได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดจึงมีการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง เช่น เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. และ *Spirulina* sp เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Borowitzka, 1999)

(2) สภาวะการเติบโตแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (photoheterotrophic growth)

การเติบโตแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกหรือมิคโซโทรฟิก (mixotrophic growth) เป็นสภาวะการเติบโตที่สาหร่ายใช้แสงและใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน (Vonshak *et al.*, 2000) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกมักใช้ความเข้มแสงต่ำๆ จึงสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาการเติบโตของสาหร่ายถูกยับยั้งเนื่องจากความเข้มแสงสูงๆ (photoinhibition) จากปัญหาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดภายใต้สภาวะโฟโตอโตโทรฟิกไม่สามารถชักนำให้เซลล์สะสมสารรงควัตถุได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดเพื่อผลิตสารรงควัตถุ จากรายงานพบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด สาหร่ายใช้เวลาในระยะพักเซลล์นานมากกว่า 200 ชั่วโมง อัตราการเติบโตจำเพาะ 0.0083 ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตของไฟโคไซยานิน (phycocyanin) 55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.026 ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฟโคไซยานิน 120 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Chen *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกเพื่อผลิตชีวมวล เช่น สาหร่าย *Chlorella sorokiniana* (Lee *et al.*, 1996)

(3) สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic growth)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกเป็นการเพาะเลี้ยงแบบระบบปิดในที่มืด และมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกมาใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสาหร่ายบางชนิดสามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกและมีศักยภาพที่จะเติบโตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ดี (Apt and Behrens, 1999) และยังสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายสะสมสร้างเมแทบอลิต์บางชนิดได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปของไขมัน ซึ่ง Xu *et al.* (2006) รายงานว่าการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกสามารถกระตุ้นให้เซลล์สะสมไขมันเพิ่มขึ้นจาก 14 เป็น 52 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาของอาหารเพาะเชื้อ พบว่าอาหารเพาะเชื้อของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีราคาสูงกว่าอาหารเพาะเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตอโตโทรฟิก นอกจากนี้ Chen (1996) ได้อธิบายถึงปัญหาและแนวทางแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเฮเทอโรโทรฟิกดังนี้

- สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีน้อยชนิดแนวทางที่ใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นคือ คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จากการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย พบว่ามีสาหร่ายหลายชนิดที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก เช่น สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* สามารถผลิตกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ได้ดีกว่ายีสต์และสาหร่ายชนิดอื่นด้วย (Runninget *et al.*, 1994) ไดอะตอม *Nitzschia alba* และไดโนแฟลกเจลเลตน้ำเค็ม *Cryptocodinium cohnii* เป็นแหล่งผลิตที่ตีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดกรดอีพีเอ (eicosapentaenoic acid, EPA) และกรดดีเอชเอ (docosahexaenoic acid, DHA) ตามลำดับ (Kyle, 1996)

- การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกจะเกิดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย หากเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่สาหร่ายมีการเติบโตได้ช้ากว่าแบคทีเรียมาก การแก้ปัญหาที่เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (axenic culture) การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกในระดับห้องปฏิบัติการไม่ค่อยประสบปัญหาการปนเปื้อน แต่หากขยายขนาดการเพาะเลี้ยงมักเกิดปัญหาการปนเปื้อนได้ง่าย

- การเติบโตของสาหร่ายถูกยับยั้งเมื่อสารอาหารที่อยู่ในอาหารเพาะเชื้อในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์หมดลง ในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์มีรายงานพบว่า การเติบโตของสาหร่าย *Chlorella protothecoides* ถูกยับยั้งด้วยสารอาหารที่มีความเข้มข้นมากเกินไป (substrate inhibition) คือเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 40 กรัมต่อลิตร (Shi *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบครั้งคราว (fed-batch culture) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) เพื่อใช้ในการแก้ปัญหา

- การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกไม่สามารถผลิตสารเมแทบอลิต์พวกรงควัตถุได้ เนื่องจากการสะสมสารรงควัตถุในเซลล์สาหร่ายจำเป็นต้องใช้แสงเป็นตัวชักนำให้เกิดการสะสม ดังนั้นหากต้องการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตสารรงควัตถุบางชนิดสามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโพลีเฮเทอโรโทรฟิก เช่น การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* เพื่อผลิตไฟโคไซยานิน และเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เพื่อผลิตแอสตาแซนทีน (astaxanthin) (Chen *et al.*, 1996; Ma and Chen, 2001)

1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พงษ์ธร (2552) ศึกษาความหลากหลายของชนิดและปริมาณแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมจากผลการศึกษารายงานว่าการแพร่กระจายตัวของไดอะตอมชนิดต่างๆ มีทั้งที่พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม เช่น *Pleurosigma* sp., *Gyrosigma* sp., *Bacillaria* sp. และ *Thalassionema* sp. ไดอะตอมเป็นแพลงก์ตอนพืชที่สำคัญที่สุดเนื่องจากจำนวนมากที่สุดและแพร่กระจายทุกน่านน้ำ มีประโยชน์หลายด้าน ด้านอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์และสัตว์น้ำทั่วไป โดยเฉพาะลูกสัตว์น้ำขนาดเล็ก

ยลวิภา (2545) ศึกษาการศึกษาความหลากหลายและการใช้ Benthic Diatoms เป็นตัวชี้คุณภาพน้ำที่ผ่านการบำบัดของโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท พบว่า โรงงานผลิตเบียร์มีค่าดัชนีความหลากหลายของ benthic diatom สูงที่สุด โดยใช้ไดอะตอม 2 ชนิด เป็นตัวบ่งชี้บอกคุณภาพของแหล่งน้ำเสีย คือ *Nitzschia palea* และ *Cymbella minuta* ซึ่งเป็นชนิดที่ทนทานต่อแหล่งของน้ำเสีย ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และได้แบ่งลักษณะแหล่งน้ำเป็น 3 แบบ ตามชนิดของไดอะตอมที่ศึกษาได้ คือ (1) saprophilous ไดอะตอมที่พบ เช่น *Nitzschia palea*, *Navicula mutica*; (2) eurysaprobic ไดอะตอมที่พบ เช่น *Nitzschia amphibian* และ (3) saproxenous ไดอะตอมที่พบ เช่น *Nitzschia dissipata*

Lee *et al.* (2009) ศึกษาศักยภาพของไดอะตอม *Achnanthes longipes*, *Amphora coffeaeformis* และ *Navicula* sp. เพื่อเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ด้วยการเก็บตัวอย่างไดอะตอมจากธรรมชาติและนำมาแยกจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ เลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร F/2 จึงนำไปทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมี ผลปรากฏว่าไดอะตอมสามารถนำไปพัฒนาศักยภาพให้เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้เป็นอย่างดี เนื่องจาก มีความปลอดภัย และมีผลกระทบต่อ

จินตนาและคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันที่สะสมในแพลงก์ตอนพืชบางชนิดโดยทำการรวบรวมหัวเชื้อที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยวิธี isolation จากนั้นนำหัวเชื้อที่บริสุทธิ์ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ได้แก่ Conway Walane, BG-11, F/2 และ Zarrouk โดยให้ความเข้มข้นแสง 3000 – 5000 ลักซ์ เลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่า *Navicula* sp. และ *Nitzschia* sp. สะสมไขมันอยู่ในเซลล์เท่ากับ 9.80 และ 9.40 % ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Wang *et al.* (2014) ได้ศึกษาผลผลิตชีวมวล ไขมันรวมทั้งหมด องค์ประกอบของกรดไขมันของไดอะตอมน้ำเค็มสายพันธุ์ *Chaetoceros muelleri* ในที่สภาวะที่มีระดับของคาร์บอนไดออกไซด์ต่างกัน โดยมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ 0.12 กรัม/ลิตร (1×10^6 เซลล์) เลี้ยงในอาหารเติมอากาศธรรมดาและอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03% 10% 20% และ 30% พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 10% โดยให้ชีวมวลเท่ากับ 1.059 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.868 ต่อวัน และผลผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.272 กรัมต่อลิตรต่อวัน และคลอโรฟิลล์ที่เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสง พบว่าในระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 10% พบปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุดเท่ากับ 1.658 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ไขมันรวมวิเคราะห์โดยวิธีคำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 10% ให้ไขมันรวมมากที่สุด โดยมีน้ำหนักแห้งของเซลล์เท่ากับ 43.43% องค์ประกอบของกรดไขมันวิเคราะห์โดยวิธี GC-MS พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 10% มีกรดไขมันสูงสุดที่ 84.82% และกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ในระดับต่ำมาก 10.26-16.76% แต่องค์ประกอบหลักของกรดไขมันที่มีลักษณะเด่นคือ C14-C18 เป็นพื้นฐานของกรดไขมันทั้งหมดมากกว่า 92% โดยสรุปแล้วลักษณะเด่นของกรดไขมันที่มีห่วงโซ่สั้นและร้อยละของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำ มีความสำคัญกับศักยภาพในการผลิตไบโอดีเซลได้ ซึ่งการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะที่เติมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10% สาหร่ายมีการเติบโตได้ดีโดยให้ผลผลิตชีวมวล ไขมันรวม และกรดไขมัน ได้ผลดีที่สุดซึ่งจะส่งผลถึงศักยภาพในการนำไปผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพต่อไป

Dahiya (2010) กล่าวว่าเซลล์ขนาดเล็กตั้งแต่หน่วยไมครอนไปจนถึงมิลลิเมตร อย่างเช่นสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* มีขนาด 2-10 ไมครอน เซลล์ดังกล่าวและเซลล์อื่นๆ ซึ่งอยู่ในกลุ่มแพลงก์ตอนพืชนี้ เรียกว่าสาหร่ายสามารถเติบโตได้รวดเร็ว และสาหร่ายยังเป็นผู้ผลิตขั้นพื้นฐานที่สร้างสมดุลให้กับสิ่งมีชีวิตบนโลก เป็นฐานของห่วงโซ่อาหารและผู้ผลิตออกซิเจนหลักมากกว่า 70%

Mata *et al.* (2010) ได้กล่าวว่า การผลิตพลังงานหมุนเวียนที่ยั่งยืนเริ่มเป็นที่สนใจและเข้าใจมากขึ้นว่าเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นแรกส่วนใหญ่มาจากการผลิตจากธัญพืชและน้ำมันจากเมล็ด แต่จะถูกจำกัดความสามารถทางการผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ และผลกระทบทางการเติบโตทางเศรษฐกิจ ปัญหาเหล่านี้เพิ่มความน่าสนใจในการพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สอง ซึ่งผลิตจากวัตถุดิบที่ไม่ใช่อาหาร เช่น ผลิตจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็กซึ่งอาจจะเป็นโอกาสที่ดีที่สุดในระยะยาวของการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ สายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่นำมาผลิตไบโอดีเซลมากที่สุดจะถูกนำเสนอ และข้อดีหลักจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้สำหรับผลิตไบโอดีเซลอยู่แล้ว และการออกแบบการผลิตสาหร่ายทะเลขนาดเล็กจะถูกพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยมีการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรฟิก เฮเทอโรโทรฟิก โฟโตเฮเทอโรโทรฟิก ส่วนศักยภาพอื่นๆ ที่สาหร่ายสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น การกำจัด

คาร์บอนไดออกไซด์ การบำบัดน้ำเสีย ในสุขภาพของมนุษย์ ประยุกต์อาหารและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้สาหร่ายที่เติบโตในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ

1.6.2 ได้สาหร่ายสำหรับผลิตมวลชีวภาพ จำนวน 2 ชนิด และได้สาหร่ายสำหรับผลิตไขมัน จำนวน 2 ชนิด โดยทราบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายดังกล่าว

1.6.3 ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยสามารถนำไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการหรือวารสาร ซึ่งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

2. เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1: การแยกและจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย

การเก็บตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยใช้ถุงลากลากแพลงก์ตอนและเก็บหिन จาก (1) บริเวณชายฝั่งทะเล 2 แห่ง และ (2) บ่อเพาะเลี้ยงจำนวน 3 บ่อ ซึ่งในระหว่างเก็บตัวอย่างสาหร่ายต้องตรวจวัดพารามิเตอร์ต่างๆ ในแหล่งน้ำ เช่น อุณหภูมิ pH ความเค็ม น้ำ ค่าอัลคาไลน์ตี ปริมาณไนเตรตและฟอสเฟต ปริมาณสารอินทรีย์ (Strickland and Parson, 1972)

การแยกสาหร่ายให้เป็นชนิดเดียวด้วยวิธี *Single cell isolation* และการทำให้สาหร่ายปราศจากการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

แยกสาหร่ายจากตัวอย่างที่เก็บมาด้วยวิธี *single cell isolation* (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542) โดยนำ *pasteur pipette* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาดึงปลายให้เล็กด้วยการลนปลาย *pasteur pipette* ด้วยไฟจากนั้นนำสายซิลิโคนมาใส่ที่ปลายอีกด้านหนึ่งของ *pasteur pipette* หยดน้ำที่มีสาหร่ายตัวอย่างลงบนสไลด์และส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาเซลล์สาหร่าย จากนั้นใช้ *pasteur pipette* ดูดเซลล์สาหร่ายที่ต้องการ นำเซลล์สาหร่ายไปล้างในอาหารสูตร F/2 (Guillard, 1973) ที่หยดไว้ และล้างเซลล์ให้สะอาดอีกประมาณ 2-3 ครั้ง จึงดูดเซลล์ไปใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปวางในที่มืดแสงเพื่อให้สาหร่ายเติบโต

เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร F/2 ที่ผสมสารละลายยาปฏิชีวนะที่ ตามรายงานของ Stain (1975) เพื่อให้สาหร่ายปราศจากการปนเปื้อนแบคทีเรียหลังจากที่สาหร่ายมีการเติบโตบนอาหารแข็งดังกล่าว ต้องย้ายโคโลนีสาหร่ายไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนอีกครั้งด้วยวิธีการเลี้ยงสาหร่ายลงบนอาหารสูตร F/2 (Bridson, 1995) เมื่อมีโคโลนีเกิดขึ้นจึงย้ายลงในอาหารเหลวสูตร F/2 ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตรประมาณ 3 มิลลิลิตร และจากนั้นจึงเลี้ยงขยายปริมาณในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองลำดับต่อไป

การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายที่แยกได้

การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายด้วยวิธีตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วจดบันทึกและวาดภาพลักษณะของสาหร่าย รวมถึงบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล จำแนกชนิดจุลสาหร่ายโดยวินิฉัยจากเอกสาร (ลัดดา, 2542)

การทดลองที่ 2: การคัดเลือกสาหร่ายที่ให้ผลผลิตมวลชีวภาพและไขมันสูง

นำสาหร่ายทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงแบบปราศจากเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารสูตรอาหาร F/2 ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีการให้แสงที่ 4,300 ลักซ์ ตลอดเวลาและในระหว่างการทดลองมีการตรวจวัดพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

(1) ติดตามการเติบโตของสาหร่ายโดยใช้วิธีการนับเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Heamacytometer) และรายงานในหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร การคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของไดอะตอม (*specific growth rate, μ*) รายงานค่าในหน่วยต่อวัน (Equation 1) โดยที่

C2 และ C1 คือ จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์/มล.) ณ เวลา t_2 และ t_1 (วัน) ตามลำดับ รวมทั้งคำนวณหาผลผลิตเซลล์โตต่อตอม (biomass productivity, P_{max}) ในหน่วยเซลล์/ล./วัน (Equation 2) (Contreras Gomez *et al.*, 1998)

$$\mu = \frac{\ln C_2 - \ln C_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Equation 1}$$

$$P_{max} = C_{max} \times \mu \quad \text{Equation 2}$$

(2) สกัดไขมันเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สาหร่าย โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Bligh and Dyer (1959) โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย (Chloroform-Methanol) และรายงานในหน่วยร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้งในวันสุดท้ายของการทดลองได้เก็บตัวอย่างสาหร่าย นำมาปั่นเหวี่ยง 8000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วเติม 0.85% NaCl ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทของเหลวทิ้งและนำเซลล์ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer (รุ่น Beta 1-8 LO plus, Martin Christ) นำเซลล์แห้ง 50 มก. มาสกัดไขมันตามวิธีของ Folch *et al.* (1957) โดยเติมสารละลายผสม (Chloroform:Methanol สัดส่วน 2:1 ปริมาตร/ปริมาตร และผสม Butylated hydroxytoluene หรือ BHT ให้เป็น 0.01%) นำไปปั่นในเครื่อง Ultrasonic bath (รุ่น DT 100 H, Bendelin) นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนบนใส่กรวยแยกและเติมสารละลาย 0.88% KCl ปริมาตร 1 ใน 4 ของปริมาตรสารละลายที่แยกได้ เขย่า 1 นาที ปล่อยให้แยกชั้น เทสารละลายชั้นล่างผ่าน Na_2SO_4 เพื่อดูดความชื้น นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator (รุ่น R-210, Buchi) ฟั่นด้วยก๊าซไนโตรเจนและชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักไขมัน

(3) จากนั้นนำสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย เพื่อตรวจสอบคุณภาพของไขมัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะใช้เป็นแนวทางสำหรับเลือกสาหร่ายไปใช้ศึกษาต่อไป โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lapage and Roy (1984) นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน ด้วยเครื่อง GC (gas chromatography) ตามสถานะที่ Chi *et al.* (2007)

เริ่มจากละลายไขมัน (จากข้อ 2) ด้วยสารละลายผสม chloroform:methanol ที่ผสม BHT แล้วจึงทำการทรานเอสเทอริฟิเคชัน (tranesterification) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Christie (2003) เริ่มจากเติมสารละลายไขมันและ Methanol ที่มี 1% H_2SO_4 ในสัดส่วน 1:10 ตามลำดับ บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เติม 5% NaCl และ Hexane สัดส่วน 0.5:1 ของปริมาตรทั้งหมด เขย่าและปล่อยให้แยกชั้น เก็บสารละลายชั้นบนแล้วเติม 2% K_2CO_3 ด้วยสัดส่วน 1:4 ตามลำดับ เขย่า 1 นาที ปล่อยให้แยกชั้นจึงเก็บสารละลายชั้นบนกรองผ่าน Na_2SO_4 นำไประเหยและเป่าแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน จากนั้นละลายกรดไขมันด้วย n-hexane ปริมาตร 1 มล. เก็บในขวด vial ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำสารละลายกรดไขมันไปวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (รุ่น 7890A, Agilent) อุปกรณ์ตรวจวัด (detector) เป็น Flame Ionization Detector (FID) คอลัมน์รุ่น 19091N-133, HP-INNOWAX (Agilent) ความยาว 30 ม. เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มม. และเคลือบด้วย Polysiloxanes และ Polyethyleneglycol หนา 0.25 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ด้วยระบบ split (5:1) อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม (carrier

gas) 1.1 มล./นาที่ อุณหภูมิจุดฉีดสาร 240 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ detector 260 องศาเซลเซียส โดยเริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้ นาน 0.50 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 170 องศาเซลเซียส อัตราเพิ่ม 5 องศาเซลเซียส/นาที่ และคงอุณหภูมิไว้ 10 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 190 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่ม 3 องศาเซลเซียส/นาที่ และคงอุณหภูมิไว้ 15 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียส/นาที่ และคงอุณหภูมินาน 8 นาที รวมเวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 66.5 นาที ทำการจำแนกชนิดกรดไขมันโดยเปรียบเทียบกับ retention time ของกรดไขมันมาตรฐาน F.A.M.E Mix C14-C22 (Supelco) และ PUFA No.1 Marine Source (Supelco)

เมื่อทราบผลการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างที่กล่าวในข้างต้นแล้ว จะสามารถคัดเลือกสารายที่ให้ผลผลิตมวลชีวภาพและผลผลิตไขมันสูงอย่างละ 2 ชนิด ตามลำดับ เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 ผลการทดลอง

(1) การแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบริเวณจังหวัดจันทบุรี

จากการศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 3 บ่อ คือ (1) บ่อเลี้ยงกุ้งขาวขนาดบ่อ 5.5 ไร่ และมีความหนาแน่นของกุ้งขาว 14500 ตัว/ไร่ ที่เลี้ยงมาเป็นเวลา ประมาณ 60 วัน (2) บ่อเลี้ยงปูทะเลแบบธรรมชาติ ซึ่งเป็นบ่อดินขนาด 4 ไร่ ความลึกประมาณ 2 เมตร ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงจะมีน้ำเติมเข้าและออกจากบ่อตามการขึ้น-ลงของน้ำตามธรรมชาติ และ (3) บ่อเลี้ยงปลากะพงขาว เป็นบ่อดิน ขนาด 2 ไร่ และเลี้ยงปลาด้วยความหนาแน่นประมาณ 500 ตัว และมีระยะเวลาการเลี้ยงปลาประมาณ 180 วัน ทั้งนี้ ตารางที่ 2.1 แสดงถึงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง สัตว์น้ำทั้ง 3 บ่อ ที่ทำการแยกสาหร่าย

ตารางที่ 2.1 คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ทำการแยกสาหร่ายขนาดเล็ก (ค่าเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน)

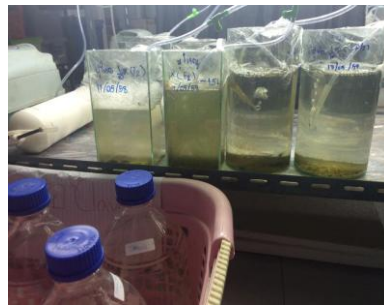
| พารามิเตอร์ | สถานที่เก็บตัวอย่าง | | | |
|--|-----------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|
| | บ่อพักน้ำใน ฟาร์มเลี้ยงกุ้ง | บ่อเพาะเลี้ยง กุ้งขาว | บ่อเพาะเลี้ยง ปูทะเล | บ่อเพาะเลี้ยง ปลากะพงขาว |
| พิกัด (N,E) | 12.57, 102.01 | 12.57, 102.01 | 12.58, 102.04 | 12.69, 102.09 |
| pH | 2.88±0.02 | 7.72±0.04 | 8.28±0.07 | 7.61±0.05 |
| ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) | 6.42±0.12 | 7.90±0.23 | 8.20±0.89 | 5.33±0.06 |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 33.00±0.00 | 30.63±0.23 | 33.033±0.06 | 31.07±0.06 |
| ความเค็ม (psu) | 8.67±1.16 | 24.00±1.00 | 25.00±0.00 | 10.00±0.00 |
| ความเข้มแสง (Klux) | 116.78±1.780 | 1019.00±2.65 | 1068.00±17.79 | 1500.00±0.00 |
| อัลคาไลน์ดี (มิลลิกรัม/ลิตร) | - | 136±0.00 | 85.00±0.00 | 85.00±0.00 |
| แอมโมเนีย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) | 0.87±0.00 | 0.66±0.09 | 0.19±0.05 | 0.58±0.05 |
| ไนไตรต์ (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) | 0.08±0.003 | 0.08±0.00 | 0.01±0.00 | 0.00±0.00 |
| ไนเตรท (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) | 0.83±0.09 | 0.04±0.03 | 0.30±0.00 | 0.09±0.07 |
| ซิลิเกต (มิลลิกรัม-ซิลิเกต/ลิตร) | 1.62±0.13 | 0.06±0.05 | 1.18±0.11 | 1.00±0.20 |
| ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร) | 0.01±0.01 | 0.03±0.00 | 0.01±0.00 | 0.04±0.00 |

เมื่อนำตัวอย่างน้ำจากแต่ละแหล่งมาที่ห้องปฏิบัติการจากนั้นเติมอาหาร F/2 ที่มีความเค็ม เท่ากับบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำแต่ละบ่อ และวางในห้องที่มีอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และเติมอากาศตลอด เวลานาน 4 วัน ทั้งนี้เพื่อเพิ่มจำนวนสาหร่าย จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าน้ำ

จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำทุกบ่อมีทั้งสาหร่ายสีเขียวและไดอะตอมอาศัยปะปนกันอยู่หลายชนิด (ภาพที่ 2.1(ก-ข)และ (ค))



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 2.1 การบ่มน้ำตัวอย่างในห้องที่มีอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และเติมอากาศตลอดเวลาานาน 4 วันโดยเป็นน้ำตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง (ก) น้ำตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงปู และ (ข) น้ำตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว (ค)

จากนั้นจึงแยกสาหร่ายด้วยวิธี sing cell isolation ทั้ง 3 สถานที่ พบว่า

(1) บ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาว พบ 24 ไอโซเลต จากนั้นนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่าสามารถเลี้ยงได้มี 2 ไอโซเลต

(2) บ่อเลี้ยงปูทะเล พบ 8 ไอโซเลต ที่มีลักษณะคล้ายกันจึงนำมาเลี้ยงในสภาวะห้องปฏิบัติการเพียง 1 ไอโซเลต

(3) บ่อเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลต ที่สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้

ลักษณะโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้แสดงดังภาพที่ 2.2(ก-ข) ซึ่งเชื้อที่เติบโตบนอาหารแข็งจะสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีต่างกัน เมื่อย้ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลวสูตร F/2 พบว่าเซลล์เติบโตได้ดีและไม่พบว่ามีกรปนเปื้อนจากสาหร่ายชนิดอื่น (ภาพที่ 2.2ข)



(ก)

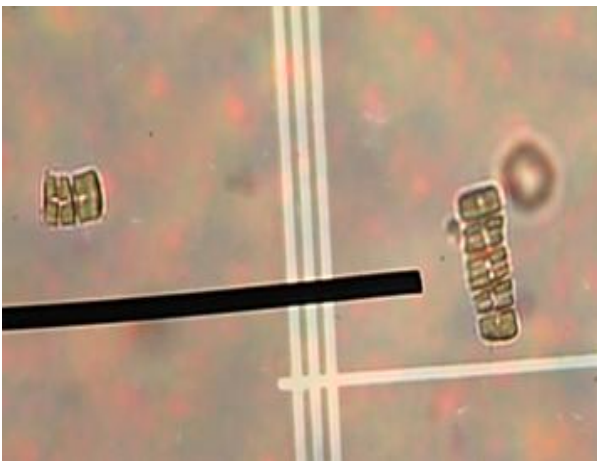



(ข)

ภาพที่ 2.2 ลักษณะการเติบโตของสาหร่ายที่แยกได้ (ก) โดยเติบโตบนอาหารวุ้น และอาหารเหลว (ข)

เมื่อนำโคโลนีเดี่ยวของสาหร่ายที่แยกได้ไปเลี้ยงต่อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวสูตร F/2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มนานประมาณ 7 วัน พบว่าสาหร่ายเติบโตขึ้น และเมื่อสอปไต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีความบริสุทธิ์เป็นชนิดเดียว ซึ่งสาหร่ายมีลักษณะดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ลักษณะของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์

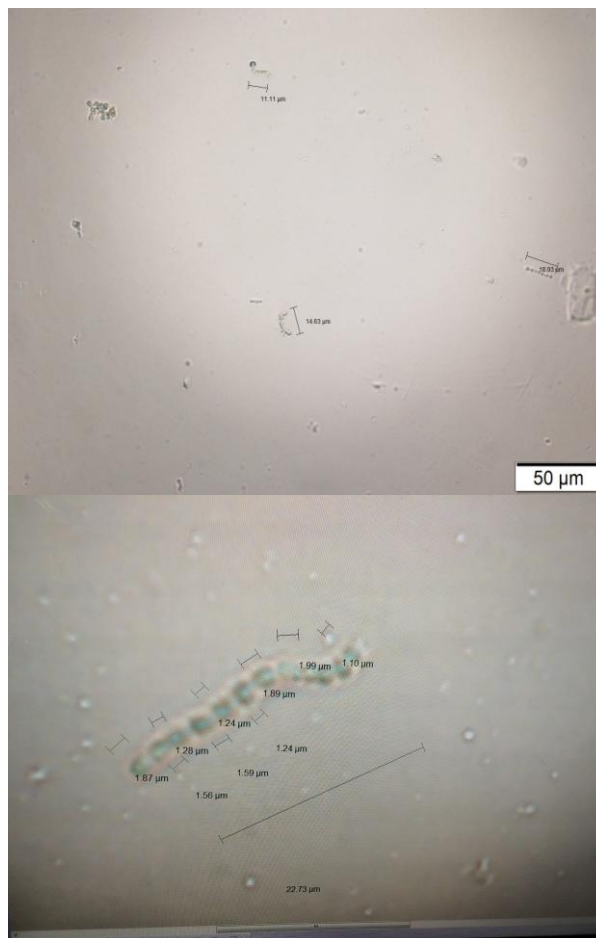
| สถานที่เก็บตัวอย่าง | ภาพถ่ายไต้กล้องจุลทรรศน์ | ลักษณะของสาหร่าย |
|----------------------------|--|--|
| บ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง |  | เซลล์มีสีน้ำตาลแกมทอง และเซลล์มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ความยาวมากกว่า 10 ไมโครเมตร และสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มของไดอะตอม <i>Nitzschia</i> sp. สายพันธุ์ BUUC1501 |
| บ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาว |  | เซลล์มีสีน้ำตาลแกมทอง และรูปร่างเหมือนถังเบียร์ โดยเซลล์มีขนาดความยาวประมาณ 13 ไมโครเมตร และสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มของไดอะตอม <i>Amphora</i> sp. สายพันธุ์ BUUC 1502 |

บ่อเพาะเลี้ยง
กุ้งขาว



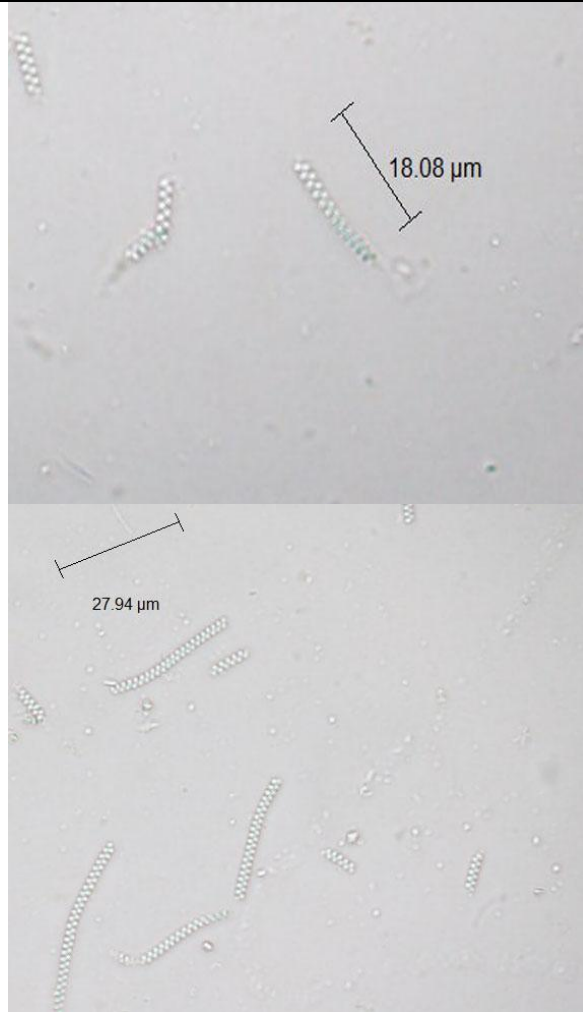
ลักษณะเป็นเส้นสาย สีเขียวแกม
น้ำเงิน (blue-green algae) อยู่
รวมกันเป็นกลุ่ม ขนาดเซลล์ยาว
มากกว่า 150 ไมครอนสาหร่ายนี้
เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่ง
ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ จึงให้
ชื่อเป็น Unknown
BUUC1503

บ่อเพาะเลี้ยง
ปูทะเล



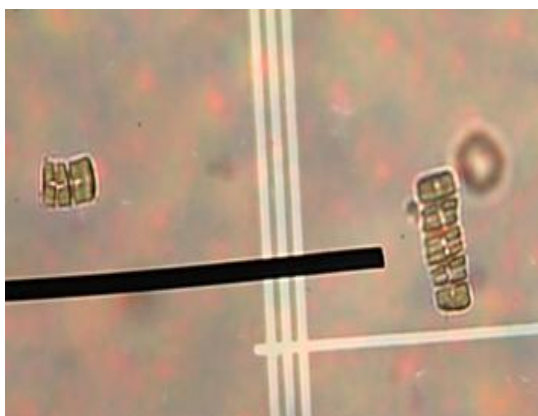
สาหร่ายมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น
เรียงต่อกันเป็นเส้นสาย และแต่
ละเซลล์มีขนาดเล็กประมาณ
1.1-1.9 ไมโครเมตร สาหร่ายนี้
เป็นสาหร่ายนี้อยู่ในดิวิชัน
Cyanophyta สีเขียวแกมน้ำ
เงิน ซึ่งยังไม่สามารถจัดจำแนก
ได้ จึงให้ชื่อเป็น Unknown
BUUC1504

บ่อเพาะเลี้ยง
ปลากระพงขาว

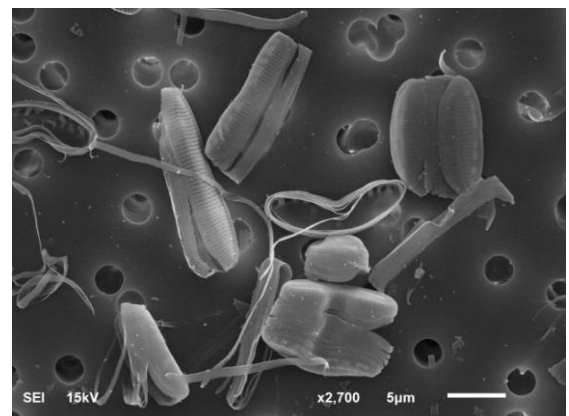


สาหร่ายมีรูปร่าง เป็นสายบิด
เป็นเกลียว มีสีเขียวแกมน้ำเงิน
ขนาดเซลล์ยาวมากกว่า 18
ไมครอน สาหร่ายนี้เป็นสาหร่าย
สีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล
Spirulina สายพันธุ์
BUUC1505

ทั้งนี้สาหร่ายที่สามารถแยกจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และทำให้ให้บริสุทธิ์ รวมทั้งนำมา
เลี้ยงในห้องปฏิบัติการและเติบโตได้ดี สามารถแสดงลักษณะได้ในภาพที่ 2.3-2.6

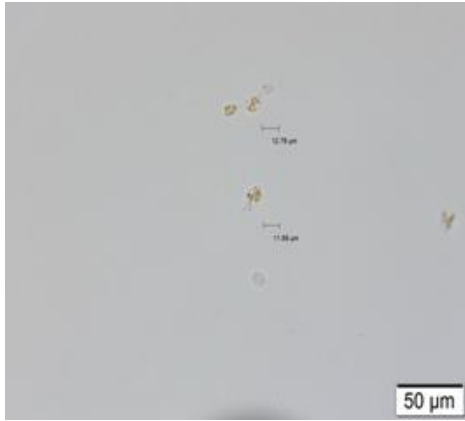


(ก)

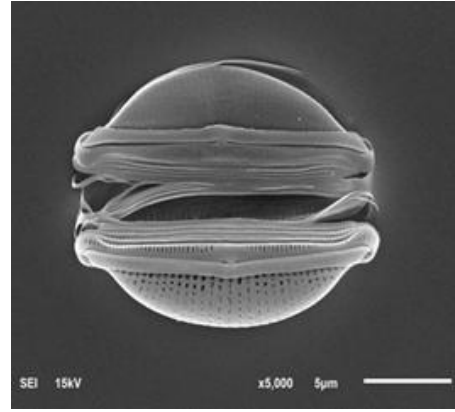


(ข)

ภาพที่ 2.3 ลักษณะของสาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501 ภายใต้กล้อง light microscope (ก) และ
scanning electron microscope (ข) ในบ่อพักน้ำที่มีความเป็นกรด (pH 2.88) ของฟาร์มเลี้ยงกุ้งสิน
ภิรมย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี

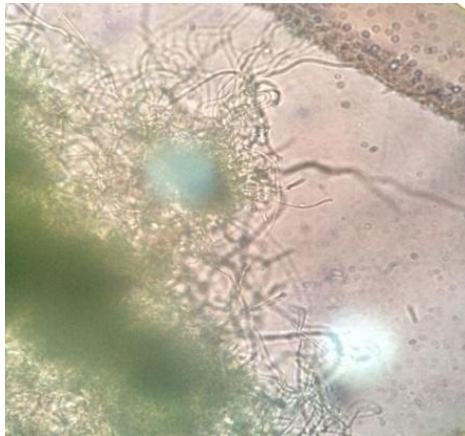


(ก)

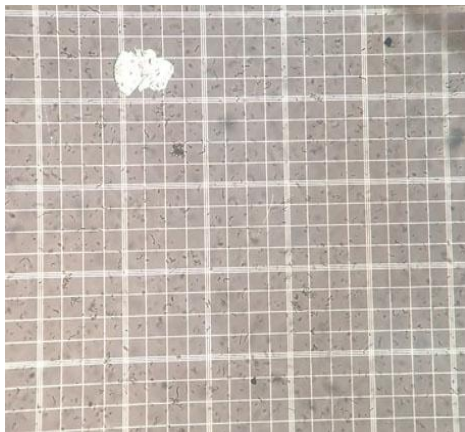


(ข)

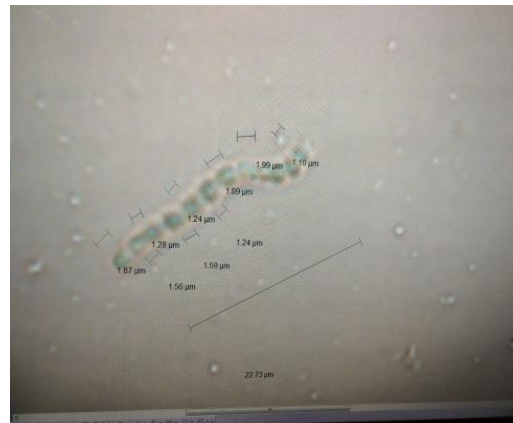
ภาพที่ 2.4 ลักษณะของสาหร่าย *Amphora* BUUC1502 (ก-ข) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown SP1503 (ค) ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งของสินทรัพย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี ที่น้ำในบ่อที่มีค่าอัลคาไลน์สูงถึง 136 ± 0.00 มิลลิกรัม/ลิตร



(ค)

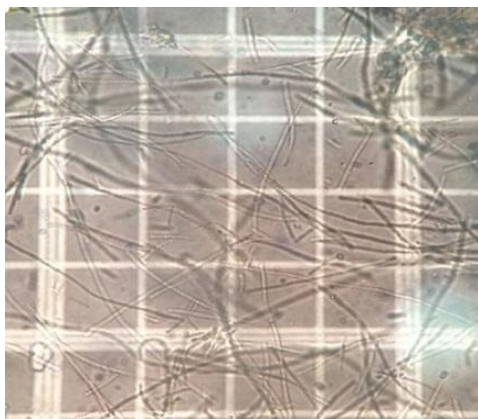


(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.5 ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown BUUC1504 (ก-ข) ที่แยกจากบ่อเลี้ยงปูทะเลแบบธรรมชาติ ในตำบลสีพญา อำเภอกาบัง จังหวัดจันทบุรี



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.6 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina* สายพันธุ์ BUUC1505 (ก-ข) แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา กะพงขาว ในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี

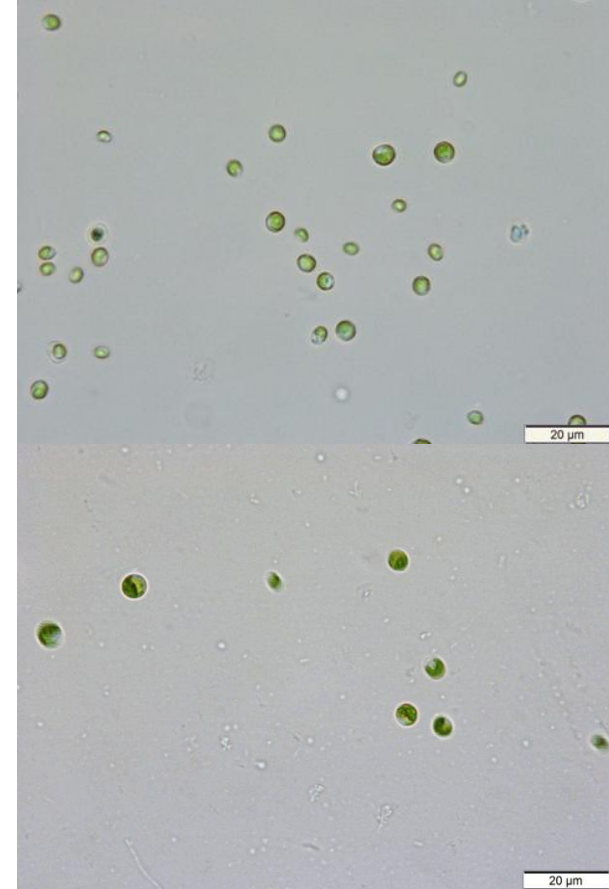

(2) การแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ

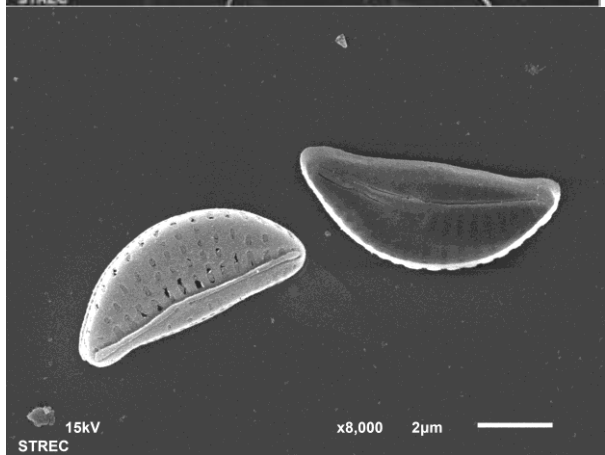
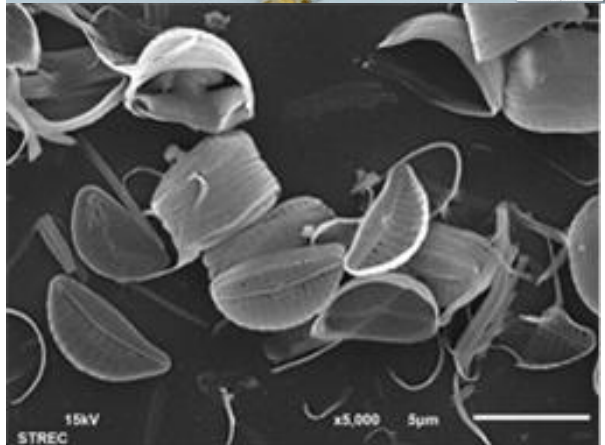
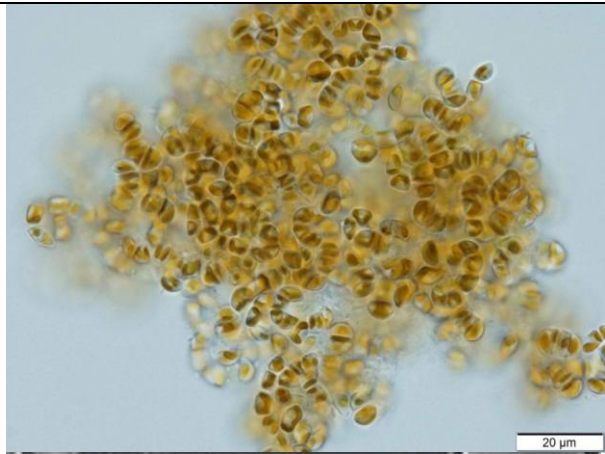
เก็บตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ จำนวน 2 แหล่ง คือ บริเวณสะพานท่าเรือประมงอ่าวหมู อำเภอแหลมสิงห์ และ คลองปากน้ำ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี ซึ่งคุณภาพน้ำแสดงดังตารางที่ 2.3 ทั้งนี้ได้ดำเนินการแยกสาหร่ายด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการแยกสาหร่ายจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยพบว่า บริเวณสะพานท่าเรือประมงอ่าวหมู อำเภอแหลมสิงห์ สามารถแยกเชื้อที่สามารถเติบโตในห้องปฏิบัติการและปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ ได้เพียง 1 ไอโซเลท ส่วนบริเวณคลองปากน้ำ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี พบว่าแยกเชื้อได้ 1 ไอโซเลทเช่นกัน ลักษณะของสาหร่ายที่แยกได้แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติที่ทำการแยกสาหร่ายขนาดเล็ก (ค่าเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| พารามิเตอร์ | สถานที่เก็บตัวอย่าง | |
|---|--|---|
| | สะพานท่าเรือประมงอ่าวหมู อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี | คลองปากน้ำ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี |
| พิกัด (N,E) | 12°29'32", 102°2'18" | 12.67043, 101.841369 |
| pH | 8.38±0.03 | 7.92±0.14 |
| ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) | 6.45±0.06 | 4.01±0.21 |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 24.83±0.06 | 32.47±0.00 |
| ความเค็ม (psu) | 39.67±0.58 | 31.02±1.00 |
| ความเข้มแสง (Klux) | 179.33±13.28 | 81.6±2.33 |
| อัลคาไลน์ตี (มิลลิกรัม/ลิตร) | - | 102.00±0.00 |
| แอมโมเนีย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) | 0.52±0.01 | - |
| ไนไตรต์ (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) | 0.05±0.01 | - |
| ไนเตรท (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) | 0.14±0.01 | - |
| ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร) | 0.02±0.00 | - |

ตารางที่ 2.4 ลักษณะของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์

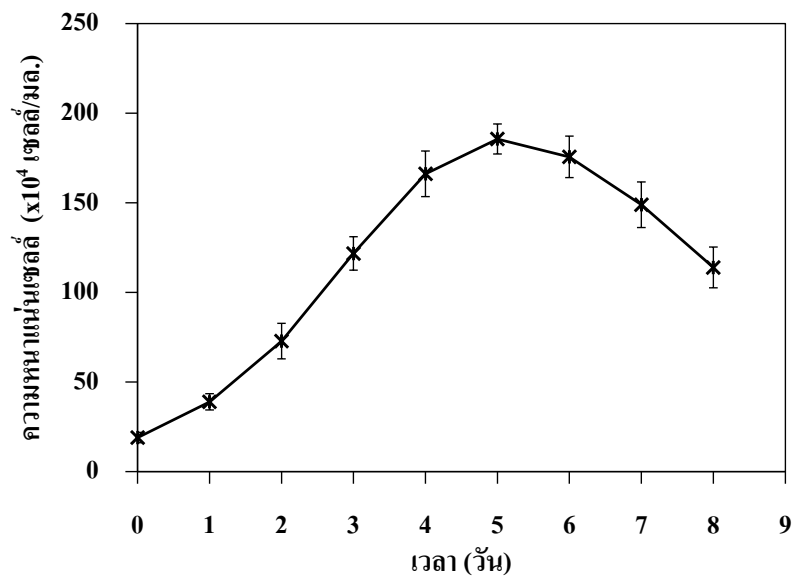
| สถานที่เก็บตัวอย่าง | ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์ | ลักษณะของสาหร่าย |
|---|--|---|
| สะพานท่าเรือ ประมงอำเภอมู อำเภอสลบลม สิงห์ |  | เซลล์เดี่ยว มีสีเขียว รูปร่างกลม และคลอโรพลาสต์มีลักษณะคล้ายถ้วยหรือเกือบกลม เซลล์มีขนาดเล็กกว่า 8 ไมโครเมตร จำแนกได้เป็น <i>Chlorella</i> สายพันธุ์ BUUC1601 |
| คลองปากน้ำ อำเภอนายายอาม |  | เซลล์มีสีน้ำตาลแกมทอง และรูปร่างเหมือนถังเบียร์ เซลล์มีความยาวไม่เกิน 8 ไมโครเมตร จัดเป็นไดอะตอม <i>Amphora coffeaeformis</i> (BUUC1602) |



(3) การเติบโตของสาหร่ายที่แยกได้จากในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จังหวัดจันทบุรี

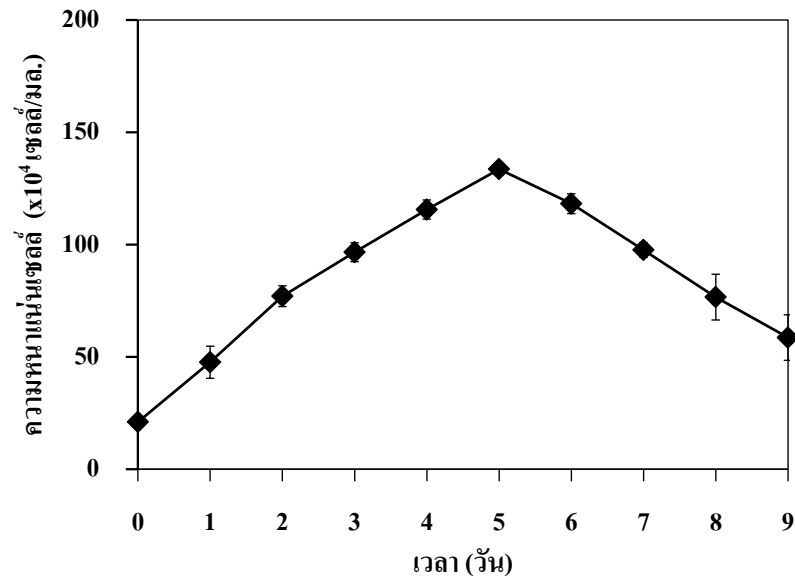
เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เลี้ยงในอาหาร F/2 (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975) ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถแยกได้จำนวน 5 ไอโซเลต และผลการทดลองมีดังนี้

เมื่อเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 แยกจากบ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว ในอำเภอท่าใหม่ เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเริ่มต้นเท่ากับ 13×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร มีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 185×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และสามารถคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.55 ต่อวัน ดังแสดงในภาพที่ 2.7



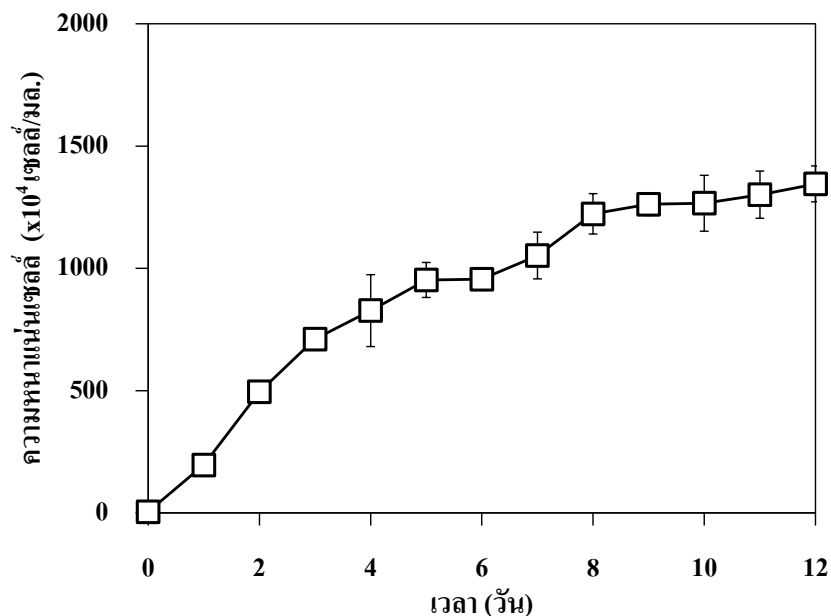
ภาพที่ 2.7 การเติบโตของสาหร่าย *Nitzschia* sp. BUUC1501 ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว และนำมาเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ด้วยอาหาร F/2 เป็นเวลา 8 วัน

ในการเลี้ยงสาหร่าย *Amphora* sp. BUUC1502 ซึ่งเป็นไดอะตอมที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ในสภาวะนอกห้องปฏิบัติการ ทดลองเลี้ยงนาน 13 วัน พบว่าในช่วงเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 21×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เติบโตจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 133.6×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ในวันที่ 5 และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.47 ± 0.07 ต่อวัน (แสดงในภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.8 การเติบโตของสาหร่าย *Amphora* sp. BUUC1502 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาว เป็นไดอะตอม และนำมาเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ด้วยอาหาร F/2 เป็นเวลา 9 วัน

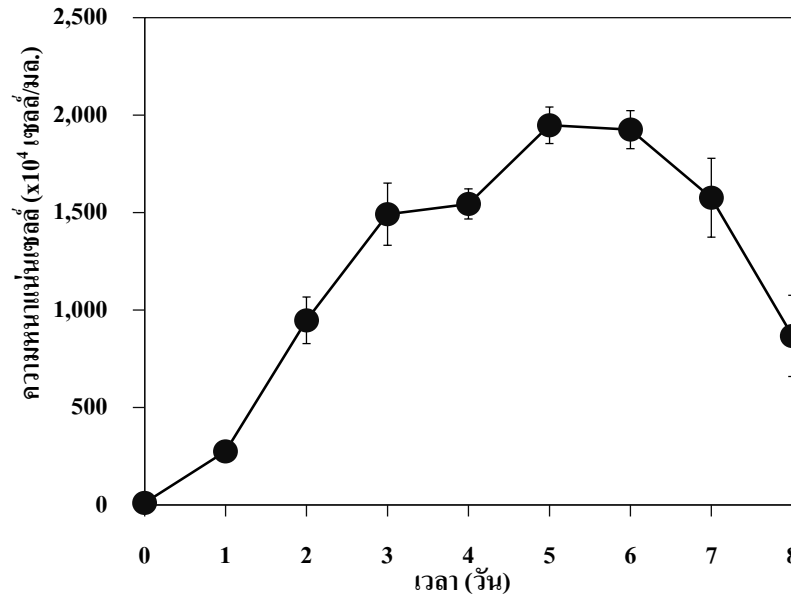
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นเส้นสาย Unknown BUUC1503 เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ทดลองเลี้ยงนาน 12 วัน พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงระยะวันที่ 0-3 ของการทดลอง 2.45 ± 0.69 ต่อวัน และในวันเริ่มต้นทดลอง มีเซลล์ 5.00×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นเซลล์เพิ่มขึ้น สูงสุดในวันที่ 12 ของการทดลอง เท่ากับ 1345.56×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 การเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown SP1503 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยง กุ้งขาว แล้วนำมาเลี้ยงในปฏิบัติการ ด้วยอาหาร F/2 เป็นเวลา 12 วัน

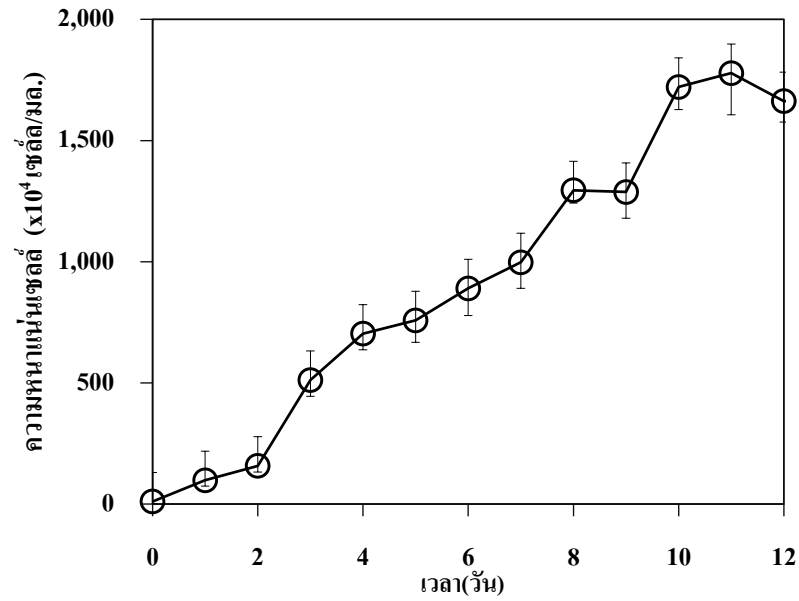
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown BUUC1504 ที่แยกจากบ่อเพาะเลี้ยงปูทะเล ใน อำเภอกำแพงแสนและนำมาเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการนาน 8 วัน พบว่าสาหร่ายเติบโตได้อย่าง

รวดเร็ว โดยมีเซลล์เริ่มต้น 10.56×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เซลล์มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง เท่ากับ 1948.60×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (ภาพที่ 2.10) ซึ่งในวันที่ 0-4 ของการทดลอง มีอัตราการเติบโตจำเพาะ 2.27 ± 0.72 ต่อวัน



ภาพที่ 2.10 การเติบโตของสาหร่าย Unknown BUUC1504 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปูทะเลเป็นสาหร่ายสีเขียว

เมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina* sp. BUUC1505 แยกจากบ่อเพาะเลี้ยงปลา กะพงขาว ในอำเภอกำแพงแสน ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ นาน 12 วัน เริ่มต้นจากใช้เซลล์เริ่มต้น 10.84×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร พบว่าเซลล์เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 11 ของการทดลอง เท่ากับ 1778.34×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (แสดงในภาพที่ 2.11) และพบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 1.68 ± 0.72 ต่อวัน (ในช่วงวันที่ 0-3)



ภาพที่ 2.11 การเติบโตของสาหร่าย *Spirulina* sp. BUUC1505 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปลา กะพงขาว ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและเซลล์บิดเป็นเกลียว

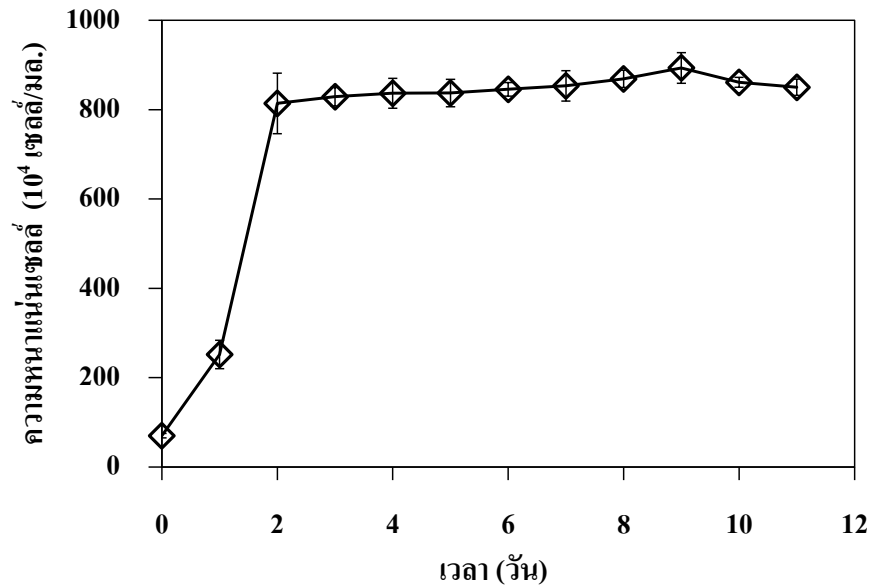
ตารางที่ 2.5 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงสัตว์ น้ำที่แตกต่างกัน พบว่าสาหร่าย Unknown BUUC1504 ที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปู สามารถเติบโตได้ รวดเร็วโดยใช้เวลาเลี้ยงเพียง 5 วัน และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina* sp. ที่แยกได้จากบ่อ เลี้ยงปลากระพงขาวสามารถให้เซลล์สูงสุดมากกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนลำดับรองลงมาคือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown BUUC1503 และสาหร่ายสีเขียวแกม น้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย Unknown SP1503 ที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง ส่วนไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 และ *Amphora* BUUC1502 ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำและบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง กลับให้จำนวนเซลล์สูงสุดได้ต่ำที่สุด

ตารางที่ 2.5 การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ต่างชนิดกัน โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันในข้อมูลตามแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

| สถานที่ | ไอโซเลต | ลักษณะสาหร่าย | อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน) | จำนวนเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร) |
|-----------------------|------------------|---|-------------------------------|---|
| บ่อพักน้ำในฟาร์มกุ้ง | <i>Nitzschia</i> | เซลล์มีสีน้ำตาลแกมทอง และ | 0.55±0.02 | 129.17 ± 6.03 ^C (วันที่ 5) |
| | BUUC1501 | เซลล์มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ความยาวมากกว่า 10 ไมโครเมตร | | |
| บ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาว | <i>Amphora</i> | เซลล์มีสีน้ำตาลแกมทอง และ | 0.47±0.70 | 133.6±2.64 ^C (วันที่ 5) |
| | BUUC1502 | รูปร่างเหมือนถังเบียร์ เซลล์มีขนาดความยาวประมาณ 13 ไมโครเมตร | | |
| | Unknown | ลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย | 2.45±0.69 | 1345.56±73.39 ^B (วันที่ 12) |
| | BUUC1503 | และมีสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เกาะกันเป็นกลุ่ม ขนาดเซลล์ยาวมากกว่า 150 ไมครอน | | |
| บ่อเพาะเลี้ยงปูทะเล | Unknown | ลักษณะเซลล์มีรูปร่างท่อนสั้น | 2.27±0.72 | 1948.60±93.74 ^A (วันที่ 5) |
| | BUUC1504 | เรียงต่อกันเป็นเส้นสาย และแต่ละเซลล์มีขนาดเล็ก ประมาณ 1.1-1.9 ไมครอน | | |
| บ่อเพาะเลี้ยงปลากระพง | <i>Spirulina</i> | ลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย บิด | 1.68±0.50 | 1778.34±172.40 ^A (วันที่ 11) |
| | BUUC1505 | เป็นเกลียวอัดแน่น มีสีเขียวแกมน้ำเงิน มีขนาดยาวมากกว่า 18 ไมครอน | | |

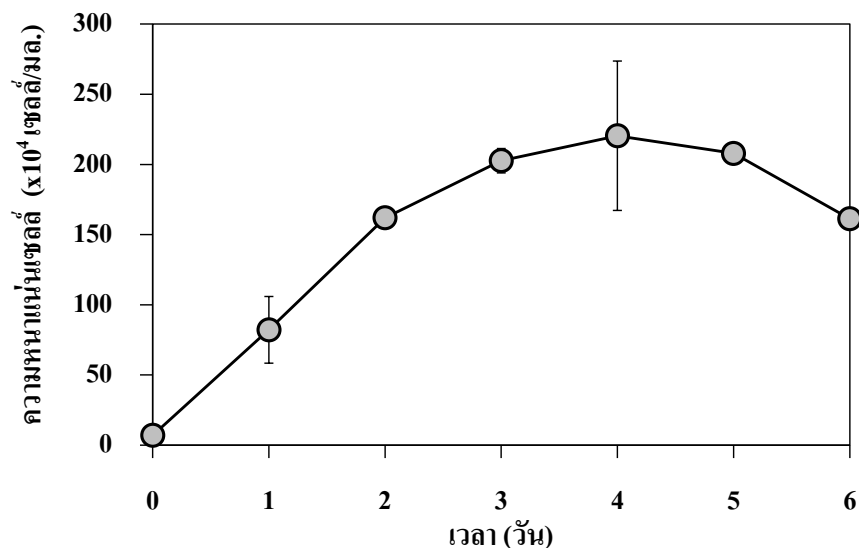
(4) การเจริญเติบโตของสาหร่ายที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ บริเวณจังหวัดจันทบุรี

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* BUUC1601 ที่แยกจากบริเวณสะพานท่าเรือประมงอ่าวหมู อำเภอลแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ที่เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 25 °C ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู ในอาหารเหลวสูตร F/2 ให้แสงตลอดเวลา พบว่าการเติบโตอย่างรวดเร็วภายในวันที่ 2 ของการทดลอง จากนั้นเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary growth phase) ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 9 ของการทดลอง มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 893.33×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (ภาพที่ 2.12) และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 1.22 ± 0.02 ต่อวัน



ภาพที่ 2.12 การเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* BUUC1601 ที่แยกจากบริเวณสะพานท่าเรือประมง อ่าวหมู อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602) ที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ คลองปากน้ำ จังหวัดจันทบุรี ในอาหารเพาะเชื้อสูตรกิลลาร์ด F/2 ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 7.03×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร มีการเพิ่มจำนวนขึ้นจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 220.44×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะได้ระหว่างวันที่ 0 ถึง 1 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 2.46 ต่อวัน ดังภาพที่ 2.13 และตารางที่ 2.6



ภาพที่ 2.13 การเติบโตของไดอะตอม *Amphora coffeaeformis* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ คลองปากน้ำ จังหวัดจันทบุรี

ตารางที่ 2.6 การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ บริเวณจังหวัดจันทบุรี โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันในข้อมูลตามแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

| สถานที่ | ไอโซเลต | ลักษณะสาหร่าย | อัตราการเติบโต จำเพาะ (ต่อวัน) | จำนวนเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร) |
|--|---|--|-----------------------------------|--|
| สะพานท่าเรือ ประมงอ่าวหมู อำเภอแหลม สิงห์ จังหวัด จันทบุรี | <i>Chlorella</i> BUUC1601 | เซลล์เดี่ยว มีสีเขียว รูปร่าง กลมและคลอโรพลาสต์มี ลักษณะคล้ายถ้วยหรือเกือบ ม้า เซลล์มีขนาดเล็กกว่า 8 ไมโครเมตร | 1.22±0.02 | 893.33±34.27 (วันที่ 3) |
| คลองปากน้ำ อำเภอนายาย อาม จังหวัด จันทบุรี | <i>Amphora</i> <i>coffeaefor</i> <i>mis</i> | เซลล์มีสีน้ำตาลแกมทอง เซลล์ พบเกาะกลุ่มรวมกัน และ รูปร่างเหมือนถังเบียร์ ขนาด ความยาวไม่เกิน 8 ไมโครเมตร | 2.46±0.34 | 220.44±53.21 (วันที่ 4) |

(5) ผลผลิตมวลชีวภาพของสาหร่ายที่แยกได้จากจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณจังหวัดจันทบุรี

สาหร่ายที่แยกได้สามารถเติบโตได้ในสภาวะห้องปฏิบัติการ ซึ่งในแง่ของผลผลิตมวลชีวภาพที่ได้พบว่า Unknown BUUC1504 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปูทะเลจะให้ผลผลิตเซลล์ได้สูงสุด (ตารางที่ 2.7) รองลงมาคือ Unknown BUUC1503 และ *Spirulina* BUUC1505 ตามลำดับ แต่สาหร่ายทั้ง 3 ชนิดนี้ประสบปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย และเมื่อเก็บรักษาหัวเชื้อไว้เกิดการปนเปื้อนจากสาหร่ายอื่น จึงไม่สามารถนำมาใช้การทดลองต่อไปได้

ดังนั้นสาหร่าย *Chlorella* BUUC1601 ซึ่งเป็นสาหร่ายที่แยกจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติจึงเป็นชนิดที่น่าสนใจเพราะให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงถึง $1,089 \times 10^7$ เซลล์/ลิตร/วัน และไดอะตอม *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602) รวมถึงสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ *Nitzschia* BUUC1501 และไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 ก็มีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากเซลล์เติบโตได้ในห้องปฏิบัติการโดยไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น อีกทั้งไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 ยังมีเซลล์ขนาดใหญ่ จมตัวได้ดี จึงสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย

ในการทดลองขั้นต่อไปจึงจะเลือกใช้สาหร่ายที่แยกจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ 2 ชนิด คือ *Chlorella* BUUC1601 และ *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602) และสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 2 ชนิด คือ *Nitzschia* BUUC1501 และไดอะตอม *Amphora* BUUC1502

ตารางที่ 2.7 ปริมาณน้ำหนักรวมและผลผลิตของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณจังหวัดจันทบุรี และนำมาเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ

| สถานที่ | ชนิดสาหร่าย | ผลผลิต ($\times 10^7$ เซลล์/ลิตร/วัน) |
|---|---|---|
| <u>บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ</u> | | |
| บ่อพักน้ำในฟาร์มกุ้ง อำเภอท่าใหม่ | <i>Nitzschia</i> BUUC1501 | 71.04 |
| บ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาว อำเภอท่าใหม่ | <i>Amphora</i> BUUC1502 Unknown BUUC1503 | 62.79 3,295 |
| บ่อเพาะเลี้ยงปูทะเล อำเภอท่าใหม่ | Unknown BUUC1504 | 4,421 |
| บ่อเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว อำเภอท่าใหม่ | <i>Spirulina</i> BUUC1505 | 2,987 |
| <u>แหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ</u> | | |
| สะพานท่าเรือประมงอำมหุม อำเภอแหลมสิงห์ | <i>Chlorella</i> BUUC1601 | 1,089 |
| คลองปากน้ำ อำเภอนายายอาม | <i>Amphora coffeaeformis</i> (BUUC1602) | 87.33 |

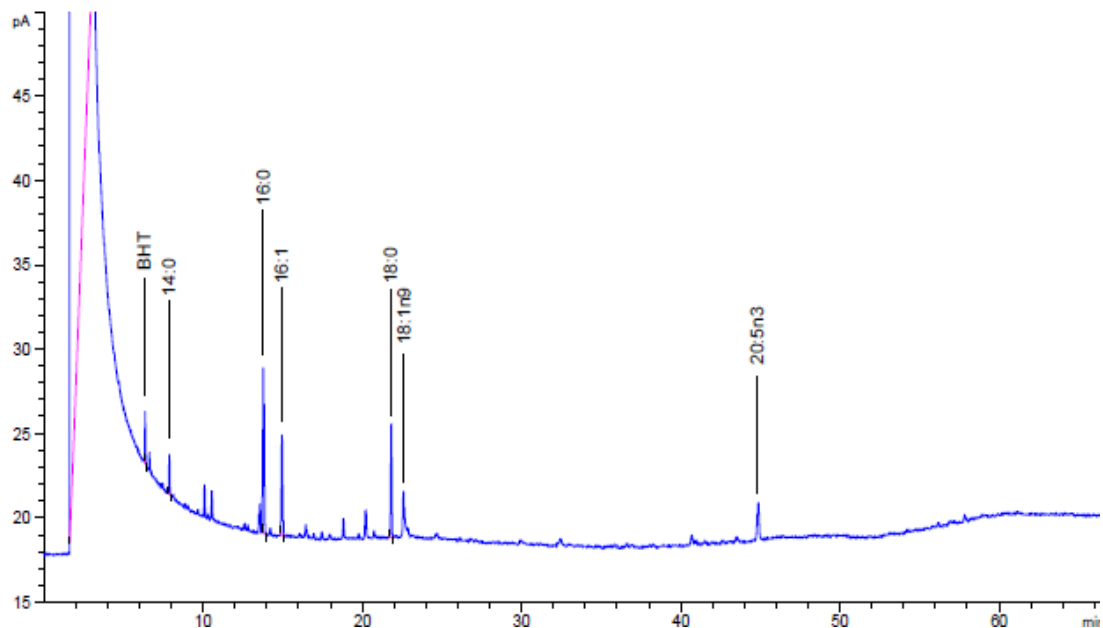
(6) ปริมาณไขมันและองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายสาหร่ายที่แยกจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติและบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่แยกจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ 2 ชนิด คือ *Chlorella* BUUC1601 และ *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602) และสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 2 ชนิด คือ *Nitzschia* BUUC1501 และไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 พบว่า *Amphora coffereformis* (BUUC1602) มีไขมันสะสมในเซลล์ $23.72 \pm 2.15\%$ ในน้ำหนักรวม ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนสาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502 และ *Chlorella* BUUC1601 มีไขมันใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 2.8)

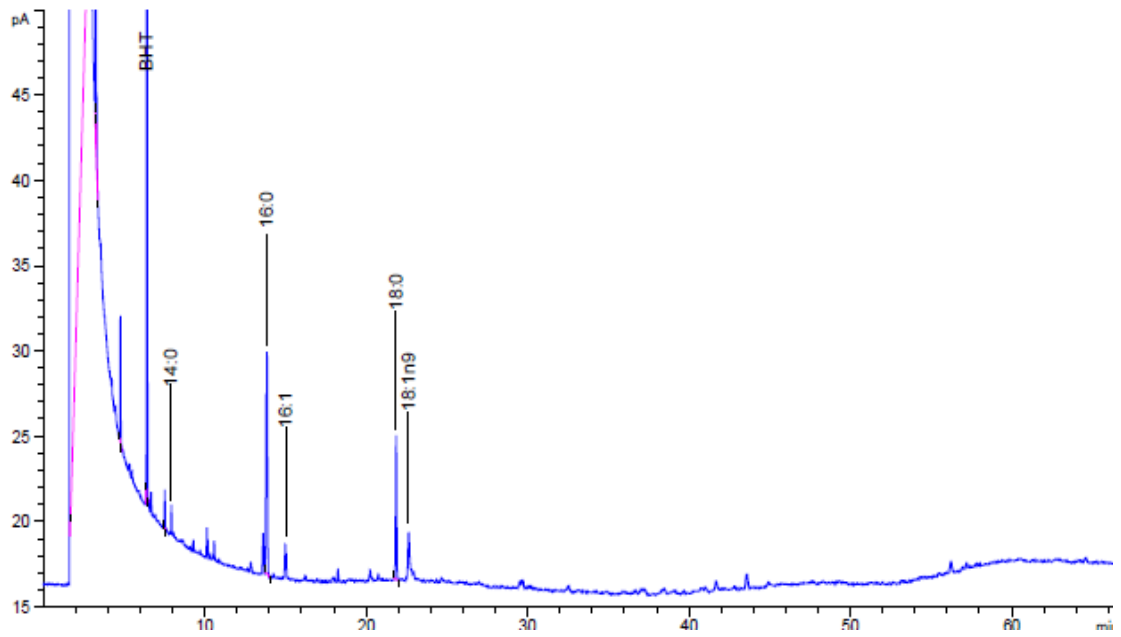
ตารางที่ 2.8 เปอร์เซนต์ไขมันในน้ำหนักแห้งของสาหร่ายที่แยกจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติและบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในข้อมูลตามแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

| สถานที่เก็บตัวอย่าง | ชนิดสาหร่าย | ไขมัน (% ในน้ำหนักแห้ง) |
|-----------------------|---|-------------------------|
| บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ | <i>Nitzschia</i> BUUC1501 | 13.45±2.63 ^b |
| | <i>Amphora</i> BUUC1502 | 12.35±0.69 ^b |
| แหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ | <i>Chlorella</i> BUUC1601 | 14.86±1.20 ^b |
| | <i>Amphora coffeaeformis</i> (BUUC1602) | 23.72±2.15 ^a |

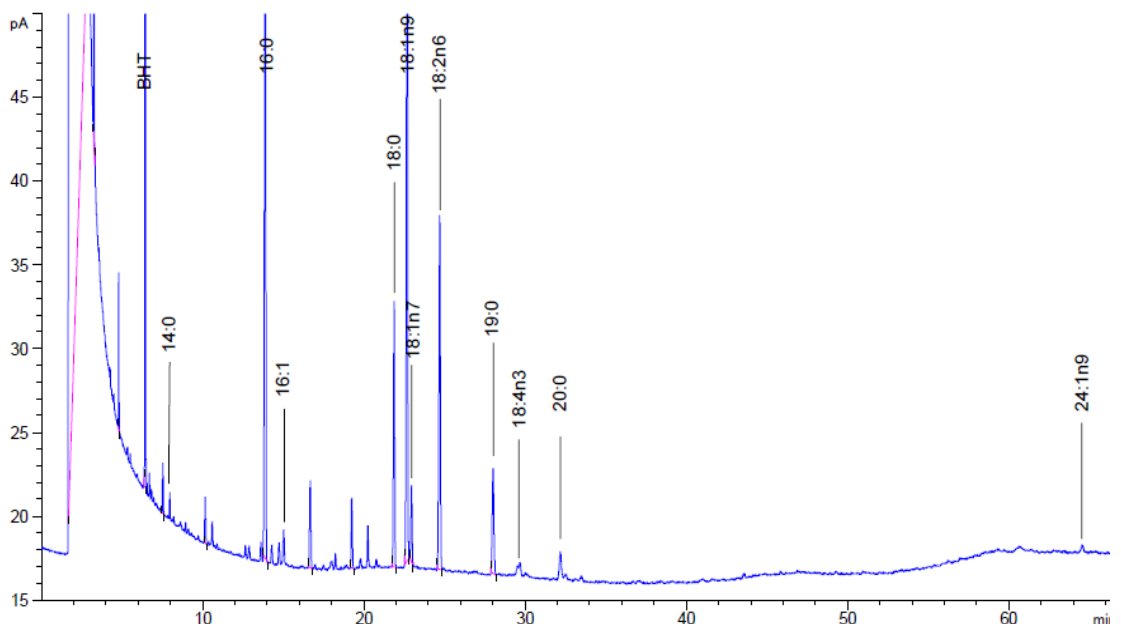
เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายโดยใช้เครื่อง GC พบว่าโครมาโตแกรมกรดไขมันของสาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, *Chlorella* BUUC1601 และ *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602) แสดงได้ดังภาพที่ 2.14, 2.15, 2.16 และ 2.17 ตามลำดับ



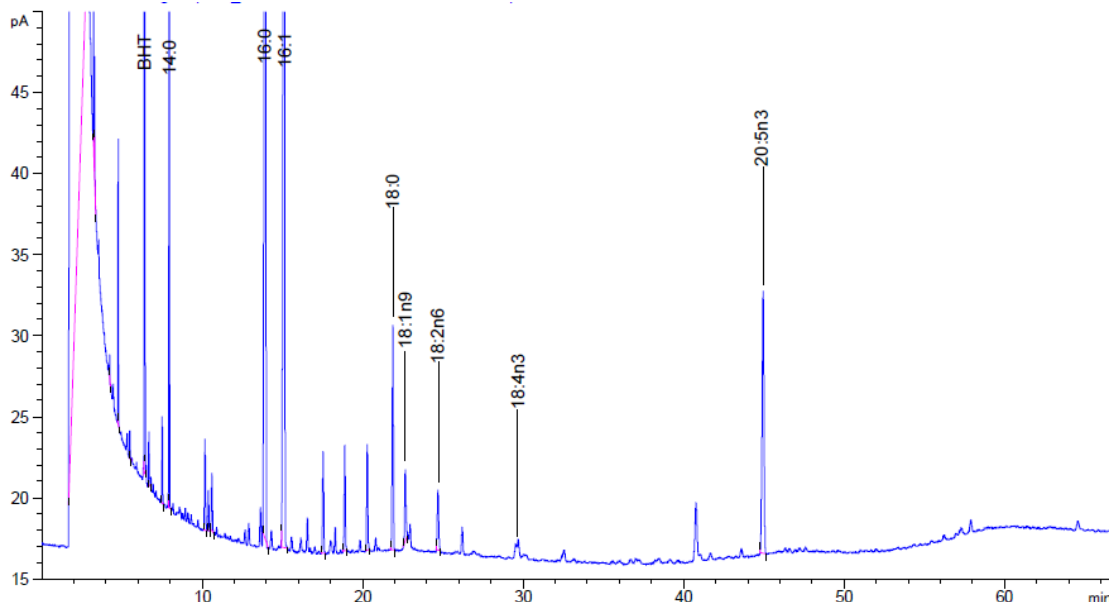
ภาพที่ 2.14 โครมาโตแกรมของกรดไขมันจากไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501



ภาพที่ 2.15 โครมาโตแกรมของกรดไขมันจากไดอะตอม *Amphora* BUUC1502



ภาพที่ 2.16 โครมาโตแกรมของกรดไขมันจากสาหร่าย *Chlorella* BUUC1601



ภาพที่ 2.17 โครมาโตแกรมของกรดไขมันจากไดอะตอม *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602)

ตารางที่ 2.9 แสดงให้เห็นว่า สาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, *Chlorella* BUUC1601 และ *A. coffeaeformis* (BUUC1602) มีกรดไขมันที่พบเหมือนกันคือ ชนิด C14:0 (myristic acid), Unidentified 1, C16:0 (palmitic acid), C16:1 (palmitoleic acid), C18:0 (stearic acid) และ C18:1n9 (oleic acid) อย่างไรก็ตาม มีกรดไขมันที่ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ คือ Unidentified 1-8 ซึ่งในสาหร่ายแต่ละชนิดพบแตกต่างกัน โดยกรดไขมัน Unidentified 3 พบเฉพาะในไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 สูงถึง 9.72%

ไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 ยังมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SFAs) 62.24% ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ ในขณะที่ *A. coffeaeformis* (BUUC1602) มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุล 1 พันธะ (mono unsaturated fatty acids, MUFAs) สูงถึง 39.61% รองลงมาคือ *Nitzschia* BUUC1501, *Chlorella* BUUC1601 และ *Amphora* BUUC1502 ตามลำดับ

กรดไขมันไม่อิ่มตัวตัวเชิงซ้อนมีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลมากกว่า 1 พันธะ (poly unsaturated fatty acids, PUFAs) พบสูงสุดในสาหร่าย *Chlorella* BUUC1601 ถึง 17.09% โดยพบ C18:2n6 (linoleic acid) และ C18:4n3 (stearidonic acid) 15.92 และ 1.17% ตามลำดับ นอกจากนี้ไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 และ *A. coffeaeformis* (BUUC1602) ยังพบ C20:5n3 (eicosapentaenoic acid, EPA) 10.52 และ 8.26% ตามลำดับ (ตารางที่ 2.9)

ตารางที่ 2.9 องค์ประกอบกรดไขมันที่พบในสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ

| Fatty acids | Retention time (min) | Fatty acids (%) | | | |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--|
| | | <i>Nitzschia</i> BUUC1501 | <i>Amphora</i> BUUC1502 | <i>Chlorella</i> BUUC1601 | <i>Amphora cofferaeformis</i> (BUUC1602) |
| C14:0 | 7.92 | 4.50±0.16 | 2.71±0.45 | 0.70±0.19 | 6.92±1.93 |
| Unidentified 1 | 10.14 | 1.56±2.71 | 4.14±0.45 | 1.31±0.20 | 1.28±0.57 |
| Unidentified 2 | 10.36 | - | 4.47±0.45 | - | 0.68±0.11 |
| Unidentified 3 | 13.58 | - | 9.72±0.45 | - | - |
| C16:0 | 13.89 | 30.94±0.87 | 36.40±0.51 | 24.40±8.80 | 31.33±8.54 |
| C16:1 | 15.07 | 19.36±0.78 | 5.44±0.47 | 1.42±0.27 | 37.77±9.83 |
| Unidentified 4 | 16.65 | - | - | 3.42±0.80 | - |
| Unidentified 5 | 17.47 | - | - | - | 1.94±0.53 |
| Unidentified 6 | 18.82 | - | - | - | 1.91±0.49 |
| Unidentified 7 | 19.23 | - | - | 2.54±0.57 | - |
| Unidentified 8 | 20.23 | - | - | 1.37±0.01 | 1.69±0.74 |
| C18:0 | 21.82 | 19.15±0.75 | 23.13±0.49 | 10.19±2.90 | 3.95±1.33 |
| C18:1n9 | 22.60 | 13.97±0.58 | 13.99±0.48 | 26.23±12.07 | 1.84±0.38 |
| C18:2n6 | 24.63 | - | - | 15.92±0.92 | 1.44±0.35 |
| C19:0 | 27.96 | - | - | 5.57±1.26 | - |
| C18:4n3 | 29.63 | - | - | 1.17±0.21 | 0.98±0.24 |
| C20:0 | 32.13 | - | - | 2.14±0.51 | - |
| C20:5n3 | 44.90 | 10.52±0.69 | - | - | 8.26±1.93 |
| C24:1n9 | 64.53 | - | - | 0.59±0.12 | - |
| SFAs | | 54.59 | 62.24 | 43.00 | 42.19 |
| MUFAs | | 33.33 | 19.43 | 31.27 | 39.61 |
| PUFAs | | 10.52 | 0.00 | 17.09 | 10.67 |
| Unidentified | | 1.56 | 18.33 | 8.64 | 7.52 |

3. อภิปรายผล

3.1 สาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ

บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีธาตุอาหารสำหรับการเติบโตของสาหร่าย โดยสาหร่ายใช้สารประกอบไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียและไนเตรทเพื่อการเจริญเติบโต (Fogg, 1975; เกรียงศักดิ์, 2553) รวมทั้งบ่อที่เก็บตัวอย่างมีฟอสฟอรัสสะสมอยู่ ซึ่งฟอสฟอรัสจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช เพราะมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ และยังพบซิลิกาที่เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นที่สุดของไดอะตอม เพราะซิลิกาเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ ซิลิกาที่ไดอะตอมนำไปใช้จะอยู่ในรูปของออร์โธซิลิเกต (Si(OH)_4) ส่วนสารประกอบซิลิกาอื่นๆ ไดอะตอมจะนำไปใช้ได้เมื่ออยู่ในรูป soluble silicate (Kaplan et al, 1986) สาหร่ายจึงสามารถเติบโตได้ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น สาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. ที่มีประโยชน์ใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงที่ประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเติบโตและการพัฒนาการของสัตว์น้ำวัยอ่อนอีกด้วย (Natrash et al., 2007) อีกทั้ง จักรพงษ์ (2552) ได้รายงานไว้ในคลองสูบน้ำและบ่อเลี้ยงกุ้ง บริเวณบ้านปากคลอง ตำบลนาทุ่ง อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร มีสาหร่ายขนาดเล็กเติบโตอยู่ได้โดยที่คลองสูบน้ำพบแพลงก์ตอนพืช 3 กลุ่ม ได้แก่ ไดอะตอม (Diatom) ไดโนแฟลกเจลเลต (Dinoflagellates) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-Green Algae) และสาหร่ายชนิดเด่นเป็นกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลตและไดอะตอม ได้แก่ *Protoperdinium* sp., *Thalassiosira* sp., *Lyrella* sp., *Nitzschia* sp. และ *Pleurosigma* sp.

อย่างไรก็ตาม การนำสาหร่ายหรือจุลินทรีย์จากน้ำเค็มธรรมชาติมาเลี้ยงให้เติบโตภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการยังทำได้ยากเนื่องจากมีจุลินทรีย์เพียง 0.001-0.1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ที่สามารถเติบโตได้ในห้องปฏิบัติ (Oren, 2004) และหากนำมาเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการต้องนำสาหร่ายผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ ซึ่งมีหลายวิธีการที่สามารถทำได้ เช่น การแยกบนอาหารแยกด้วยวิธีการ streak plate ซึ่งวิธีการนี้ช่วยให้โคโลนีความเข้มข้นมาก กระจายออกไปหรือมีความเจือจางจนมากพอที่จะทำให้แต่ละเซลล์แยกออกจากกัน และในแต่ละเซลล์จะเจริญแบ่งตัวมากขึ้นจนเป็นโคโลนีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า จึงคาดหวังได้ว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นเชื้อบริสุทธิ์

บ่อพักน้ำในฟาร์มกุ้งมีความเป็นกรด ($\text{pH} > 3$) แต่สามารถแยกไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ที่เติบโตในห้องปฏิบัติการได้ แสดงให้เห็นว่าไดอะตอมชนิดนี้ทนกรดได้ค่อนข้างดี อาจจะสามารถนำไปเลี้ยงด้วยน้ำที่มี pH สูงได้ ทั้งนี้มีรายงานว่าไดอะตอม *Nitzschia* สามารถพบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม (Ramirez et al., 2015) และ *Nitzschia* ที่แยกได้มีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่ โดยเซลล์มีขนาดยาวมากกว่า 10 ไมครอน ในมุมมองของการเพาะเลี้ยงไดอะตอมชนิดนี้สำหรับขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอาจจำเป็นต้องให้อากาศที่เพียงพอจนสามารถทำให้เซลล์สามารถฟุ้งกระจายในมวลน้ำเพื่อสัมผัสกับอาหารและอากาศได้อย่างทั่วถึง ส่วนการเก็บเกี่ยวเซลล์นั้นอาจจะสามารถทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากเมื่อหยุดอากาศพบว่าเซลล์มีการตกตะกอนจึงสามารถเทส่วนใสออกและได้เซลล์เข้มข้นได้ ไดอะตอม *Nitzschia* มักอุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว ω -3 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง eicosapentaenoic acid (EPA) ที่มีผลดีต่อสุขภาพมนุษย์และสัตว์ (Xiaohong et al., 2008)

ไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง เซลล์มีสีน้ำตาล ดำรงชีวิตแบบยึดเกาะจึงจัดเป็นไดอะตอมท้องน้ำ (benthic diatom) เซลล์อยู่เดี่ยวๆ ฝาของเซลล์เป็นครึ่งวงกลมหรือคล้ายทวน ราพี (Rape) ขนาดเรียวยาวเล็ก ตรงหรือโค้งเล็กน้อยและจะอยู่ใกล้กับขอบเซลล์ด้านเวนทรัล ลวดลายบนฝาละเอียดและมีพื้นที่ว่างตรงกลางเซลล์ เป็น pennate diatom และจัดอยู่ใน Division Bacillariophyta, Family Naviculaceae ทั้งนี้ไดอะตอมเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงถึงคุณภาพของ

แหล่งน้ำได้โดยจะพบสาหร่ายชนิดได้ ในแหล่งน้ำนิ่งและน้ำไหลเอื่อย (ยูวดี, 2556) จากงานวิจัยของ Shaari *et al.* (2011) พบว่าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาค่า ประเทศมาเลเซีย จะพบสาหร่าย *Amphora* sp. เมื่อเลี้ยงกุ้งนาน 2-3 สัปดาห์ ซึ่งบ่อมี pH 8.07- 8.12 ปริมาณออกซิเจนในน้ำ 6.9-7.3 มิลลิกรัม/ลิตร และความเค็ม 30 psu ในขณะที่งานทดลองครั้งนี้แยกสาหร่าย *Amphora* sp. BUUC1502 จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวที่มี pH 7.72±0.04 ออกซิเจนในน้ำ 7.90 ±0.23 มิลลิกรัม/ลิตร ความเค็ม 24 psu ทั้งนี้ *Amphora* sp. เป็นไดอะตอมที่อุดมด้วยคุณค่าทางโภชนาการ โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่ม ω -3 และ ω -6 ซึ่งสามารถนำไดอะตอมชนิดนี้มาใช้ในการเลี้ยงหอยเป่าฮื้อได้ดี (de la Peña, 2007)

สาหร่าย Unknown BUUC1503 อยู่ในดิวิชัน Cyanophyta เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีลักษณะเป็นเส้นสายและอยู่รวมกลุ่มกัน ข้อดีที่สังเกตพบในระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย Unknown BUUC1503 คือ เมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตเต็มที่พบว่าสาหร่ายเกาะกลุ่มกันและลอยอยู่ที่บริเวณผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงอาจถือได้ว่าอาจจะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เกาะกลุ่มกันเป็นแผ่นและลอยอยู่ที่ผิวน้ำได้ง่าย การที่สาหร่ายชนิดนี้สามารถลอยขึ้นมาสะสมที่บริเวณผิวน้ำได้เนื่องจากภายในเซลล์สาหร่ายบางกลุ่มจะมี gas vacuoles เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ และหากเซลล์ได้รับแสงความเข้มที่สูงจะให้เกิดแรงดัน และลอยตัวขึ้นมาได้ (González-Fernández and Ballesteros, 2012) ดังนั้นจึงอาจจะสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายชนิดนี้ได้ด้วยวิธีการกระตุ้นให้เซลล์เกิดรวมกลุ่มและลอยตัวมาสะสมที่ผิวน้ำ (auto-flocculation) และสาหร่ายนี้ยังสามารถนำมาเลี้ยงในสภาวะห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย แต่ประสบปัญหาในการเก็บรักษาเชื้อ เพราะเซลล์สาหร่ายมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่เติบโตได้เร็วกว่าสาหร่ายชนิดนี้

บ่อเพาะเลี้ยงปูทะเลแยกได้สาหร่าย Unknown BUUC1504 เซลล์มีขนาดเล็กมาก ประมาณ 1.1-1.9 ไมครอน และเซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสาย ข้อดีคือเซลล์เจริญเติบโตที่เร็วภายในเวลา 5 วัน และเซลล์แขวนลอยได้ดีในน้ำเลี้ยงสาหร่ายและไม่ตกตะกอน อย่างไรก็ตามสาหร่ายชนิดนี้อาจจะทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ยาก เพราะเซลล์มีขนาดเล็กมาก อีกทั้งยังประสบปัญหาในการเก็บรักษาเชื้อ เพราะเซลล์สาหร่ายมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

Spirulina sp. BUUC1505 แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปลากระพงขาว เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ล่องลอยเป็นอิสระ โดยทั่วไปพบเป็นเส้นสาย มีขนาดความยาวเซลล์ประมาณ 15-30 ไมครอน อาจพบหลุดเป็นท่อนเซลล์เดี่ยวได้ เซลล์เป็นรูปทรงกระบอก ไม่มีซีท เส้นสายขดม้วน หรือแบบโค้งงอเป็นลูกคลื่นปลายเส้นสายไม่เรียวยแหลม ผนังเซลล์ระหว่างเซลล์ที่ต่อกันอาจไม่ชัดเจนปลายเซลล์โค้งมน จัดจำแนกอยู่ในดิวิชัน Cyanopyta แฟมิลี Oscillatoriales (ยูวดี, 2556) สาหร่าย *Spirulina* พบเจริญเติบโตอยู่ในแหล่งน้ำที่มี pH สูงๆ ประมาณ 7.65-8.49 (Shaari *et al.*, 2011) ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่าบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มี pH ในช่วง 7-8.3 ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ จากหลายงานวิจัยพบว่ามีสาหร่าย *Spirulina* เจริญเติบโตได้ในบ่อน้ำที่มีความเค็ม เช่น *Oscillatoria* sp., *Anabaena* sp., *Chlorella* sp., *Navicula* sp., *Chlamydomonas* sp., *Gyrosigma* sp., *Gyrosigma* sp., *Cylindrotheca closterium* เป็นต้น ในการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* BUUC1505 ได้ติดตามการเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ด้วยวิธีการนับเซลล์อาจไม่เหมาะสมเพราะเซลล์มีการรวมกลุ่ม จึงอาจจะต้องประเมินด้วยวิธีการอื่น เช่น การหาน้ำหนักแห้ง ประโยชน์สาหร่าย *Spirulina* sp. เป็นอาหารเสริม และอาหารสำเร็จของคนและสัตว์ เนื่องจากมีโปรตีนสูงประมาณ 50-70 % ของน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งทางวงการแพทย์ก็มีการรับรองว่าเป็นสารอาหารธรรมชาติที่สมบูรณ์แบบ มีประสิทธิภาพในการปรับสมดุลของร่างกาย เสริมภูมิ

ต้านทาน ยับยั้งพิษที่ตกค้างออกจากร่างกาย ด้านอนุมูลอิสระ ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง ช่วยในการย่อยและเจริญอาหาร บรรเทาโรคหอบหืด โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากภูมิแพ้ของร่างกาย (จงกล, 2553)

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* BUUC1601 แยก *Chlorella* BUUC1601 จากอ่าวหมู่ อำเภอสระใคร จังหวัดจันทบุรี ที่เป็นอ่าวเปิดที่มีคลื่นทะเล แต่บริเวณนี้เป็นบริเวณที่ได้สะพานเรือประมง และมีบ้านเรือนจึงอาจมีสารอินทรีย์ที่ปลดปล่อยออกสู่ทะเลและเป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์แก่สาหร่ายได้ ส่งผลให้พบสาหร่ายชนิดนี้ได้ในอ่าวหมู่ สาหร่ายชนิดนี้สามารถเติบโตโดยใช้สารอินทรีย์ได้ (Shah et al., 2003; Tingting et al., 2014) ทั้งนี้ *Chlorella* มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีประสิทธิภาพในการผลิตสารเคมีและยารักษาที่มีมูลค่าสูง เช่น β -carotene, Vitamin B หรือที่เรียกว่า Thiamine และกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม PUFAs ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารเหล่านี้ในเชิงพาณิชย์ (Nisha et al., 2014)

ไดอะตอม *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602) ที่แยกได้จากคลองปากน้ำ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี มีขนาดเล็กกว่า *Amphora* BUUC1502 ซึ่งมีรายงานว่าไดอะตอมชนิดนี้อุดมไปด้วย EPA จึงชี้ให้เห็นว่าไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 อาจใช้เป็นแหล่งผลิต EPA ได้ (Wah et al., 2015) อาจใช้ผลิตสารมูลค่าสูงหรือเพื่อผลิตพลังงานทางเลือก และยังมีประโยชน์ในการเป็นอาหารสำหรับลูกสัตว์น้ำขนาดเล็กอีกด้วย

3.2 การเติบโตและผลผลิตมวลชีวภาพของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ

ถึงแม้ว่า Unknown BUUC1503 Unknown BUUC1504 และ *Spirulina* BUUC1505 จะสามารถเติบโตได้ดี โดยมีผลผลิตมวลชีวภาพมากถึง 3,295, 4,421 และ 2,987 ($\times 10^7$ เซลล์/ลิตร/วัน) ตามลำดับ แต่พบว่าสาหร่ายดังกล่าวมีปัญหาในการปนเปื้อนจากสาหร่ายชนิดอื่นและแบคทีเรีย และหากมีการปนเปื้อนและแบคทีเรียจะเติบโตได้รวดเร็วกว่าสาหร่ายส่งผลให้สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดลงอย่างรวดเร็ว สาหร่ายจึงไม่สามารถเติบโตได้ (Liang et al., 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงขอก้าวถึงเฉพาะการเติบโตของสาหร่ายชนิดที่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ เท่านั้น

ไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 แยกได้จากบ่อพักน้ำในฟาร์มกุ้ง ซึ่งมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.55 ต่อวัน และให้เซลล์สูงสุด 129×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน จากรายงานของ Ramirez et al. (2015) ที่เพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia* ที่แยกจาก Salar de Huasco ใน Northern Chilean Altiplano ซึ่งเป็นแหล่งน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและทางเคมีสูง พบว่าได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดประมาณ 72×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ทั้งนี้ได้อาหารสูตร F/2 เช่นเดียวกับงานวิจัยครั้งนี้ แต่สาเหตุที่ความหนาแน่นเซลล์ต่ำกว่า อาจเนื่องมาจาก Ramirez et al. (2015) ได้เพาะเลี้ยงไดอะตอมที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 15 องศาเซลเซียส แต่งานวิจัยนี้ได้ใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีการให้แสงที่ 4,300 ลักซ์ ตลอดเวลา

ไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 มีอัตราเติบโตจำเพาะและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกับไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ซึ่ง *Amphora* BUUC1502 มีขนาดเซลล์ที่ค่อนข้างใหญ่ โดยมีความยาวของเซลล์ประมาณ 13 ไมครอน ดังนั้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงจึงพบว่าเซลล์มักแตกตะกอนได้ง่าย อย่างไรก็ตามเซลล์ไดอะตอม *Amphora* BUUC1502 สามารถเติบโตใกล้เคียงผล

การทดลองของ de la Peña (2007) ที่เลี้ยงไดอะตอม *Amphora* sp. ที่แยกจากบ่อน้ำเกลือ โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 149×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร โดยใช้อาหาร F/2 เลี้ยงไดอะตอมเช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ด้วย

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* BUUC1601 ที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ มีการเติบโตรวดเร็วภายใน 2 วัน มีอัตราการเติบโตจำเพาะ 1.22 ต่อวัน และให้เซลล์สูงสุด 893×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร หลังจากนั้นเซลล์สามารถเติบโตในระยะคงที่ได้ยาวนานมากกว่า 8 วัน ซึ่งสาหร่ายที่แยกได้นี้เป็นสาหร่ายน้ำเค็ม แต่จากงานวิจัยของ Chia et al. (2003) พบว่าสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* ให้เซลล์สูงสุด 300×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เท่านั้น ซึ่งความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ได้มีค่าต่ำกว่าการทดลองครั้งนี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสาหร่ายต่าง species กัน และเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่างกัน

เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 ในห้องปฏิบัติการ ไดอะตอมมีการเติบโตได้รวดเร็วโดยไม่มีระยะพักเซลล์ (lag growth phase) และให้เซลล์สูงสุด 22.0×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงไปเพียง 4 วัน และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 2.46 ต่อวัน หากเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Gould and Gallagher (1990) ที่เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *A. coffeaeformis* ที่แยกได้จากธรรมชาติ พบว่าไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.06-0.27 ต่อวัน เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี มีศักยภาพที่จะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อผลิตมวลชีวภาพได้

3.3 ปริมาณไขมันและกรดไขมันของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ

สาหร่ายสามารถผลิตไขมันจากแป้งได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดอาหารจำกัด (Li et al., 2014) ไขมันจะสะสมอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และภายในเซลล์ สาหร่ายอาจมีไขมันในเซลล์อยู่ในช่วงกว้างคือ 1-70% ของน้ำหนักแห้ง ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาวะการเติบโต (Chisti, 2007) ซึ่งสาหร่ายที่ได้จากงานวิจัยนี้พบว่า *A. coffeaeformis* (BUUC1602) มีการสะสมไขมันได้สูงกว่าชนิดอื่น และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ พบว่าไขมันในสาหร่ายแต่ละชนิดอยู่ในช่วงที่พบได้ในงานวิจัยอื่น (ตารางที่ 3.1) ทั้งนี้แต่ละงานวิจัยนั้นใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายและสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

ประเด็นที่น่าสนใจ คือ สาหร่ายน้ำเค็ม *Chlorella* BUUC1601 และ *A. coffeaeformis* (BUUC1602) มีสัดส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ส่วน *Nitzschia* BUUC1501 และ *Amphora* BUUC1502 กลับมีสัดส่วนกรดไขมันอิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว แต่จากงานวิจัยของ Duong et al. (2015) พบว่าสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงถึง 62% (ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด) แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายน้ำเค็ม *Chlorella* BUUC1601 ที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ดี ซึ่งการที่สาหร่ายชนิดเดียวกันแต่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันก็ส่งผลต่อปริมาณกรดไขมันในเซลล์ได้เช่นกัน

Chlorella BUUC1601 เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) สูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่นที่แยกได้จากการทดลองนี้ โดยมีสูงถึง 17.09% ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนก็บ่งชี้ถึงประโยชน์ของ Nisha et al. (2014) โดย *Chlorella* BUUC1601 พบว่ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัว linoleic acid (C18:2n6, LA) สูงถึง 15.92% ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนมีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์เพราะไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง จึงจำเป็นต้องได้รับผ่านทางอาหารเท่านั้น

ทั้งนี้ไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 และ *A. cofferaeformis* (BUUC1602) มีปริมาณ EPA (C20:5n3) 10.25 และ 8.26% ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด จึงถือได้ว่าไดอะตอมทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้เป็นแหล่งของ EPA ได้ ซึ่ง EPA นั้นมีความสำคัญมากเนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมนต่างๆ เช่น prostaglandins เป็นต้น ด้านการอักเสบและภูมิแพ้ตนเองได้ ทั้งนี้สามารถเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยอื่นๆ ดังตารางที่ 3.2 อย่างไรก็ตามปริมาณ EPA ในไดอะตอมจะขึ้นอยู่กับสภาวะการเพาะเลี้ยง ชนิดและปริมาณสารอาหาร และความเค็ม (Xiaohong et al., 2008; Wah et al., 2015; Renaud et al., 1999)

ตารางที่ 3.1 ปริมาณไขมัน (% ในน้ำหนักแห้ง) ของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ

| ชนิดสาหร่าย | ไขมัน (% ในน้ำหนักแห้ง) | เอกสารอ้างอิง |
|--|----------------------------|------------------------|
| <i>Nitzschia</i> BUUC1501 | 13.45 | งานวิจัยครั้งนี้ |
| <i>Amphora</i> BUUC1502 | 12.35 | งานวิจัยครั้งนี้ |
| <i>A. cofferaeformis</i> (BUUC1602) | 23.72 | งานวิจัยครั้งนี้ |
| <i>Chlorella</i> BUUC1601 | 14.86 | งานวิจัยครั้งนี้ |
| <i>N. laevis</i> | 6.89-13.22 | Xiaohong et al. (2008) |
| <i>A. subacutiuscula</i> | 9-46 | Wah et al. (2015) |
| <i>Chlorella</i> | 9.95-24.2 | Wang et al. (2004) |

ตารางที่ 3.2 เปอร์เซ็นต์ EPA (ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด) ในไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 และ *A. cofferaeformis*

| ชนิดไดอะตอม | เปอร์เซ็นต์ EPA (ในปริมาณกรดไขมันทั้งหมด) | เอกสารอ้างอิง |
|---------------------------|--|------------------------|
| <i>Nitzschia</i> BUUC1501 | 10.25 | งานวิจัยครั้งนี้ |
| <i>A. cofferaeformis</i> | 8.26 | งานวิจัยครั้งนี้ |
| <i>N. laevis</i> | 19.1 | Wen and Chen (2000) |
| <i>N. closterium</i> | 15.2 | Renaud et al. (1994) |
| <i>N. laevis</i> | 1.21-3.67 | Xiaohong et al. (2008) |
| <i>A. subacutiuscula</i> | 11.9-19.0 | Wah et al. (2015) |
| <i>A. coffeaformis</i> | 1.39 | Renaud et al. (1999) |

4. สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

4.1.1 บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี สามารถแยกสาหร่ายที่เติบโตได้ในห้องปฏิบัติการ คือ จากบ่อพักน้ำของฟาร์มเลี้ยงกุ้งได้โดยอะตอม *Nitzschia* sp. BUUC1501 บ่อเพาะเลี้ยงกุ้งแยกสาหร่ายได้จำนวน 2 ไอโซเลต คือ *Amphora* sp. BUUC1502 และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเส้นสาย Unknown BUUC1503 บ่อเพาะเลี้ยงปูทะเลแยกได้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Unknown BUUC1504 และ บ่อเพาะเลี้ยงปลากะพงมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina* sp. BUUC1505

4.1.2 แหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ บริเวณสะพานท่าเรือประมงอ่าวหมู อำเภอแหลมสิงห์ แยกได้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์ BUUC1601 ส่วนบริเวณคลองปากน้ำ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี แยกได้โดยอะตอม *Amphora coffeaeformis* (BUUC1602)

4.1.3 สาหร่าย Unknown BUUC1504 ที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปูทะเลให้ผลผลิตเซลล์ได้สูงสุด รองลงมาคือ Unknown BUUC1503 และ *Spirulina* BUUC1505 ตามลำดับ แต่ในการเก็บรักษาหัวเชื้อได้เกิดปัญหาการปนเปื้อนจากสาหร่ายอื่น จึงไม่สามารถนำมาใช้การทดลองต่อไปได้

4.1.4 สาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, *Chlorella* BUUC1601 และ *Amphora coffereformis* (BUUC1602) สามารถเติบโตได้ดีในห้องปฏิบัติการ และให้ผลผลิตเซลล์ 71.04, 62.79, 1,089 และ 87.33 ($\times 10^7$ เซลล์/ลิตร/วัน) ตามลำดับ

4.1.5 *Amphora coffereformis* (BUUC1602) มีไขมันสะสมในเซลล์ $23.72 \pm 2.15\%$ ในน้ำหนักแห้ง สูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ รองลงมาคือ *Chlorella* BUUC1601, *Nitzschia* BUUC1501 และ *Amphora* BUUC1502 ตามลำดับ

4.1.6 กรดไขมันชนิด C14:0, Unidentified 1, C16:0, C16:1, C18:0 และ C18:1n9 พบได้ในสาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501, *Amphora* BUUC1502, *Chlorella* BUUC1601 และ *Amphora coffereformis* (BUUC1602)

4.1.7 สาหร่าย *Chlorella* BUUC1601 มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว PUFAs สูงที่สุดถึง 17.09% โดยพบ C18:2n6 (linoleic acid) และ C18:4n3 (stearidonic acid) 15.92 และ 1.17% ตามลำดับ

4.1.8 โดยอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 และ *A. coffeaeformis* (BUUC1602) ยังพบ C20:5n3 (eicosapentaenoic acid, EPA) 10.52 และ 8.26% ตามลำดับ

4.1.9 ดังนั้นจึงเลือกสาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501 และ *Amphora* BUUC1502 ที่แยกจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสาหร่าย *Chlorella* BUUC1601 และ *Amphora coffereformis* (BUUC1602) ที่แยกจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาถึงปริมาณผลผลิตเซลล์และกรดไขมันเมื่อเลี้ยงในสภาวะการเติบโตแบบออโตโทรฟิก มิคโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิกต่อไป

4.2. ข้อเสนอแนะ

1. การทำแต่ละไอโซเลตให้บริสุทธิ์นั้นยากถึงแม้ว่าจะใช้ยาปฏิชีวนะร่วม ซึ่งบางชนิดที่แยกแยะจะถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะได้ ดังนั้นจึงได้สาหร่ายมาน้อยชนิด
2. ในการทดลองครั้งต่อไปจะเปลี่ยนสารมาตรฐานที่มีชนิดไขมันมากกว่านี้ เพราะการวิเคราะห์ผลในครั้งนี้ พบว่าพบกรดไขมันชนิดที่ไม่สามารถจำแนกได้หลายชนิด

4.3 แนวทางการนำไปใช้ประโยชน์

จากรายงานการวิจัยในครั้งนี้พบว่า มีสาหร่ายจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและจากแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติ ที่สามารถเติบโตในห้องปฏิบัติการและสาหร่ายที่กล่าวไปในข้างต้นนี้ แต่ละชนิดมีประโยชน์ที่แตกต่างกัน อาทิ เช่น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนที่ต้องสร้างเปลือก ใช้กำจัดของเสียในรูปแบบบำบัดน้ำจากโรงงาน และนำมาสกัดไขมันเพื่อผลิตไบโอดีเซล นำมาเป็นขบวนการกรองและการหมักในโรงงานอุตสาหกรรม ผลิตอาหารเสริม เช่น สาหร่าย *Chlorella* sp. BUUC1601 มีโปรตีนมากกว่า 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และอื่นๆ อีกหลายอย่าง และสาหร่ายแต่ละชนิดยังมีลักษณะข้อดีที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อ การเก็บเกี่ยวเกี่ยวผลผลิต ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นและแนวทางการนำสาหร่ายที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

5. ผลผลิต (Output)

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

(1) มะลิวัลย์ คุดะโค, สมเกียรติ แวนมณี, ปวีณา ตปนียารวงค์, สุรเชษฐ์ บุรุษอาชาไฉย และ สรวิต เผ่าทองสุข. (๒๕๖๐). การเติบโตแบบบอโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิกของ ไดอะตอมท้องถิ่น *Nitzschia* sp. BUUC1501. แก่นเกษตร, ๔๕(ฉบับพิเศษ ๑), ๙๑๕-๙๒๐.

(2) ปวีณา ตปนียารวงค์, ญัฐชยา พึ่งละอ, ปารีชาติ ชุมทอง, มะลิวัลย์ คุดะโค และ สรวิต เผ่าทองสุข. (๒๕๖๐). การเติบโตของไดอะตอมขนาดเล็ก *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ที่แยกจากปากแม่น้ำ จังหวัดจันทบุรี ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง. แก่นเกษตร, ๔๕ (ฉบับพิเศษ ๑), ๑๓๓-๑๓๙.

(3) ปวีณา ตปนียารวงค์, เฟื่องฟ้า เสริมใหม่, พรารถนา ปานทอง, มะลิวัลย์ คุดะโค, วิชาญ กันบัว และ สรวิต เผ่าทองสุข. (๒๕๕๙). การคัดแยกไดอะตอมขนาดใหญ่จากบ่อพักน้ำของฟาร์มเลี้ยงกุ้งและการเพาะเลี้ยงในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง. แก่นเกษตร, ๔๔(ฉบับพิเศษ ๑), ๑๑๗-๑๒๓.

5.2 การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

5.3 ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ไม่มี

5.4 ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ไม่มี

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2560A10801012 สัญญาเลขที่ 42/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการผลิตนมถั่วเหลืองและไขมันจากสาหร่ายน้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะการเติบโต
แตกต่างกัน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 เดือนตุลาคม 2558 – 30 เดือนกันยายน 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 เดือนตุลาคม 2558 – 30 เดือนกันยายน 2560

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 257,500 บาท เมื่อ 11 พฤศจิกายน 2558

งวดที่ 2 (40%) 206,000 บาท เมื่อ 8 กรกฎาคม 2559

งวดที่ 3 (10%) 51,500 บาท เมื่อ -

รวม 515,000 บาท

รายจ่าย

| รายการ | งบประมาณที่ตั้งไว้ | งบประมาณที่ใช้จริง | จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน |
|---|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 1. ค่าตอบแทน | 40,000 | 40,000 | 0 |
| 2. ค่าจ้าง | 180,000 | 180,000 | 0 |
| 3. ค่าวัสดุ | 202,500 | 202,500 | 0 |
| 4. ค่าใช้สอย | 41,000 | 41,000 | 0 |
| 5. ค่าครุภัณฑ์ | 0 | 0 | 0 |
| 6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ค่าดำเนินโครงการ 10% | 51,500 | 51,500 | 0 |
| รวม | 515,000 | 515,000 | 0 |

.....
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

วันที่ 25 สิงหาคม 2560

เอกสารอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. (2553). คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- จักรพงษ์ อุดทน. (2552). ชนิดและความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชในคลองสุบและบ่อเลี้ยงกุ้งบริเวณปากคลอง ตำบลนาทุ่ง อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร.
- จินตนา สและน้อย. (2543). องค์ประกอบของกรดไขมันในแพลงก์ตอนพืชบางชนิดพิเศษ, การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 38, สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พงษ์ธร คณะนา. (2552). ศึกษาความหลากหลายของชนิดแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมในแหล่งเลี้ยงหอยนางรมบริเวณอ่าวบ้านดอม จังหวัดสุราษฎร์ธานี. ปัญหาพิเศษ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วิทยาเขตชุมพร.
- ยลรวีภัก เฉลิมศิริ. (2545). การศึกษาความหลากหลายและการใช้ Benthic Diatoms เป็นตัวชี้คุณภาพน้ำที่ผ่านการบำบัดของโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ยุวดี พิรพรพิศาล. (2556). สหรัยน้ำจืดในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2, ห้องปฏิบัติการวิจัย สหรัยประยุคต์ สาขาวิชาจุลวิทยาภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลัดดา วงศ์รัตน์ (2541). *คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน*. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. (2542). แพลงก์ตอนพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคา. 2538. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 251 หน้า.
- Apt, K. E. and Behrens, P. W. 1999. Commercial Development in Microalgal Biotechnology. *Journal of Phycology* 35: 215-226.
- Bridson, E. Y. 1995. *The Oxoid Manual*. 7ed. London: Unipath Limited. P. 166.
- Borowitzka, M. A. 1999. Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fomenters. *Journal of Biotechnology* 70: 313-321.
- Chen, F., Zhang, Y. and Guo, S. 1996. Growth and Phycocyanin Formation of *Spirulina platensis* in Photobioreactor Culture. *Biotechnology Letters* 18(5): 603-608.
- Chia, M. A., Lombard, A. T. and MELÃO, M. D. G. G. 2013. Growth and Biochemical Composition of *Chlorella vulgaris* in Different Growth Media. *An Acad Bras Cienc* 85 (4): 1427-1438.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3): 294-306.
- Chu, W. L., Phang, S. M. and Goh, S. H. 1996. Environmental Effects on Growth and Biochemical Composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. *Journal of Applied Phycology* 8: 389-396.
- Chuecas, L. and Riley, J. P. 1969. Component Fatty Acids of the Total Lipids of Some Marine Phytoplankton. *Journal of Marine Biology Assn U.K.* 49: 97-116.
- de la Peña, M. R. 2007. Cell Growth and Nutritive Value of the Tropical Benthic

- Diatom, *Amphora* sp., at Varying Levels of Nutrients and Light Intensity, and Different Culture Locations. *J Appl Phycol* 19: 647–655.
- de Mort, C. T., Lowry, R., Tinsley, I. and Phinney, H. K. 1972. The Biochemical Analysis of Estuarine Phytoplankton Species. I. Fatty Acid Composition. *Journal of Phycology* 8: 211-216.
- de Silva, T. L., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, A. C. and Gouveia, L. 2009. Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry. *Appl Biochem Biotechnol* 59: 568–578.
- Duong, V.T., Thomas-Hill, S.R. and Schent, P.M. 2015. Growth and Lipid Accumulation of Microalgae from Fluctuating Brackish and Sea water Locations in South East Queensland—Australia. *Front Plant Sci.* 6: 359-570.
- Fogg, G.E. (1975). *Algal Culture and Phytoplankton Ecology* (2nd ed). Wisconsin : The University of Wisconsin Press.
- González-Fernández, C. and Ballesteros, M. 2013. Microalgae Autoflocculation: An Alternative to High-Energy Consuming Harvesting Methods. *J Appl Phycol* 25: 991–999.
- Gould, M. D. and Gallagher, D. E. 1990. Field Measurement of Specific Growth Rate, Biomass and Primary Production of Benthic Diatom of Savin Hill Cove, Boston. *Limnol. Oceanogr.* 35(8), 1757-1770.
- Guillard, R. R. L. 1973. Method for Microflagellates and Nanoplankton. In Stein, J. R. (ed). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. New York: Cambridge University. pp. 69-89.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. and Aaronson, S. 1986. *Algal nutrition*. Florida: CRC Press.
- Kates, M. and Volcani, B. E. 1966. Lipid Component of Diatom. *Biochem. Biophys. Acta* 166: 264-278.
- Kyle, D. J. 1996. Production and Use of Single Cell Oil Which is Highly Enriched in Docosahexaenoic Acid. *Lipid Technology* 2: 106-112.
- Lapage, G. and Roy, C. C. 1984. Improved Recovery of Fatty Acid through Direct Transesterification without Prior Extraction or Purification. *Journal of Lipid Research* 25: 1391-1396.
- Lee, Y. K., Dimg, S. Y., Hoe, C. H. and Low, C. S. 1996. Mixotrophic Growth of *Chlorella sorokiniana* in Outdoor Enclose Photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 8: 163-169.
- Li, D. M. and Qi, Y. Z. 1997. Spirulina Industry in China: Present Status and Future Prospects. *Journal of Applied Phycology* 9: 25-28.
- Li, T., Zheng, Y. and Chen, S. 2014. Mixotrophic Cultivation of a *Chlorella sorokiniana* Strain for Enhanced Biomass and Lipid Production. *Biomass and Bioenergy*

66. 204-213.

- Liang, Y., Sarkany, N. and Cui, Y. (2009). Biomass and Lipid Productivities of *Chlorella vulgaris* under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions. *Biotechnol Lett.* 31(7), 1043–1049.
- Ma, R. Y. N. and Chen, F. 2001. Induction of Astaxathin Formation by Reactive Oxygen Species in Mixotrophic Culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnology Letters* 23: 519-523.
- Metting, F. B. 1996. Biodiversity and Application of Microalgae. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 477-489.
- Miller, G. L. 1959. Use of Nitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428.
- Natrah, F. M. I., Yusoff, F. M. Shariff, M. Abas, F. and Mariana, N. F. 2007. Screening of Malaysian Indigenous Microalgae for Antioxidant Properties and Nutritional Value. *J Appl Phycol* 19: 711–718.
- Nisha, P. D., Soni, R., Rahi, D. K. and Soni, S. K. (2014). Evaluation of Autotrophic and Mixotrophic Regimen *Chlorella pyrenoidosa* Cells in Various Wastes Water for Its Biochemical Composition and Biomass Production. Department of Microbiology. Chandigarh : Panjab University.
- Opute, F. I. 1974. Lipid and Fatty-Acid Composition of Diatom. *Journal of Expl. Bot.* 25: 823-835.
- Oren A. 2004. Prokaryote Diversity and Taxonomy: Current Status and Future Challenges. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 359: 623–638.
- Ramirez, E. E., Gonzalez, M. A., Cifuentes, A. S., Inostroza, I. and Urrutia, R. E. 2015. Culture and Growth of Two Benthic Diatoms Species Isolated from the Salar del Huasco (North of Chile, 20° S) at Different Conditions of Temperature, Light and Nutrient. *Gayana Bot.* 72(2): 165-176.
- Renaud, S.M., Thinh, L.V. and Parry, D.L. 1999. The Gross Composition and Fatty Acid Composition of 18 Species of Tropical Australian Microalgae for Possible Use in Marineculture. *Aquaculture.* 170: 147-159.
- Running, J. A., Huss, R. J. and Olson, P. T. 1994. Heterotrophic Production of Ascorbic Acid by Microalgae. *Journal of Applied Phycology* 6: 99-104.
- Shaari, A.L., Surif, M., Latiff, F., Maznah.,W. Omar, W. and Ahmad, M.N . 2011. Monitoring of Water Quality and Microalgae Species Composition of *Penaeus monodon* Ponds in Pulau Pinang, Malaysia *Tropical Life Sciences Research.* 22(1):51-69.
- Shah, M.M.R., Alam, M.J. and Mia, M.Y. (2003) *Chlorella* sp.: Isolation Culture and Small Scale Culture in Brackish-water. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 38(3-4), 165-174.

- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. and Roessor, P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Office of Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae. Prepared for the U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, by National Renewable Energy Laboratory, July (1998).
- Stain, J. R. 1975. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. New York: Cambridge University. 448 p.
- Strickland, J. D. and Parson, T. R. 1972. A Practical Handbook of Water Analysis. 2nd Ottawa: Fishery Research Board of Canada. 310 p.
- Tornabene, T. G., Kates, M. and Volcani, B. E. 1974. Sterol, Aliphatic Hydrocarbons and Fatty Acids of A Nonphotosynthetic Diatom *Nitzschia alba*. Lipids 9: 279-284.
- Vonshak, A., Cheung, S. M. and Chen, F. 2000. Mixotrophic Growth Modifies the Response of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanobacteria) Cell to Light. Journal of Applied Phycology 36: 675-679
- Wah. N. B., Ahmad, A.L.B., Chieh, D.C.J., Tan, A., Hwai, S. 2015. Changes in Lipid Profiles of a Tropical Benthic Diatom in different Cultivation Temperature. Asian Journal of Applied Science and Engineering, 4(2): 91-101
- Wang, X-W., Liang, J-R., Lou, C-S., Chen, C-P. and Gao, Y-H. 2014. Biomass, Total Lipid Production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in Response to Different CO₂ Levels. Bioresource Technology 161: 124-130.
- Wen, Z.Y. and Chen, F. 2000. Production Potential of Eicosapentaenoic Acid by the Diatom *Nitzschia laevis*. Biotechnol. Lett. 22: 727-733.
- Widjaja, A., Chien, C-C. and Ju, Y-H. 2009. Study of Increasing Lipid Production from Fresh Water Microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 40: 13-20.
- Yoo, C., Jun, S-Y., Lee J-Y., Ahn, C-Y. and Oh, H-M. 2010. Selection of Microalgae for Lipid Production under High Levels Carbon Dioxide. Bioresource Technology 101: 571-574.
- Xiaohong, C., Songyao, L., Chunling, W. and Meifang, L. 2008. Effects of Nutritional Factors on the Growth and Heterotrophic Eicosapentaenoic Acid Production of Diatom *Nitzschia laevis*. J. Ocean Univ. Chin. 7(3): 333-338.
- Xu, H., Miao, X. and Wu, Q. 2006. High Quality Biodiesel Production from a Microalga *Chlorella protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters. Journal of Biotechnokogy 126: 499-507.

ภาคผนวก

การเติบโตแบบออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก ของไดอะตอมท้องน้ำ *Nitzschia* sp. BUUC1501

Autotrophic, mixotrophic and heterotrophic growth of benthic diatom *Nitzschia* sp. BUUC1501

มะลิวัลย์ กุตะโค^{1*}, สมเกียรติ แวนมณี¹, ปวีณา ตปนียวรวงศ์^{2,3}, สุรเชษฐ์ บุรุษอาชาไณย^{2,3}
และ สรวิต เผ่าทองสุข^{2,3}

Maliwan Kutako^{1*}, Somkiaet Wanmanee¹, Paveena Tapaneyaworawong^{2,3},
Surachet Burut-archanail^{2,3} and Sorawit Powtongsook^{2,3}

บทคัดย่อ: ไดอะตอมท้องน้ำ *Nitzschia* sp. BUUC1501 แยกจากบ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี นำมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตที่ต่างกัน คือ สภาวะออโตโทรฟิกที่เลี้ยงในอาหารสูตรกิลลาร์ดหรือสูตร F/2 (Guillard, 1975) ความเค็ม 30 ppt ให้แสงตลอดเวลา 4,300 ลักซ์ และแบบมิกโซโทรฟิกที่เพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารสูตร F/2 ผสมอาหารสูตร NB (Nutrient broth) เติมกลูโคส 10 ก./ล. (F/2 + NB + กลูโคส) และให้แสงตลอดเวลา สุดท้ายคือสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกที่เซลล์เจริญเติบโตในที่มืดโดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร F/2 + NB + กลูโคสพบว่าไดอะตอม *Nitzschia* sp. เจริญเติบโตได้ทั้งสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.55 0.65 และ 0.45 ต่อวัน ตามลำดับ แต่ไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก และให้ผลผลิตมวลชีวภาพ 37.09 ± 1.71 และ 36.87 ± 2.72 ($\times 10^7$ เซลล์/ล./วัน.) ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ($P \leq 0.05$)

คำสำคัญ: *Nitzschia* sp., ออโตโทรฟิก, มิกโซโทรฟิก, เฮเทอโรโทรฟิก

ABSTRACT: Marine benthic diatom *Nitzschia* sp. BUUC1501 was isolated from shrimp farm reservoir at Thamai, Chanthaburi Province. Diatom was cultured under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions. The autotrophic condition was performed using Guillard's F/2 medium (Guillard, 1975) with salinity 30 ppt and 4300 Lux continuous light. Mixotrophic culture was F/2 medium supplemented with nutrient broth (NB) and 10 g/L glucose (F/2 + NB + glucose) with continuous illumination. Heterotrophic culture was conducted in F/2 + NB + glucose under dark condition. The results revealed that *Nitzschia* sp. could grow under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions with the specific grow rate of 0.55, 0.65 and 0.45 d⁻¹, respectively. With autotrophic and mixotrophic conditions, the maximum biomass productivity were 37.09 ± 1.71 and 36.87 ± 2.72 ($\times 10^7$ cells/L/day), respectively. These productivities were significantly higher than heterotrophic condition ($P \leq 0.05$).

Keywords: *Nitzschia* sp., autotrophic growth, mixotrophic growth, heterotrophic growth

¹ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

Faculty of Marine Technology, Burapha University Chanthaburi Campus

² ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Center of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

³ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
National Center of Genetic Engineering and Biotechnology

* Corresponding author: maliwan@buu.ac.th

บทนำ

ไดอะตอม (diatom) เป็นสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมากกว่า 100,000 ชนิด (Armbrust, 2009) สามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วและใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชชนิดอื่น จึงมีข้อได้เปรียบกว่าพืชชั้นสูงชนิดอื่นๆ รวมถึงไดอะตอมยังอุดมไปด้วยสารประกอบทางชีวเคมีหรือสารเมแทบอไลต์ที่มีคุณค่า เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน รงควัตถุและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Courtois de Viçose et al., 2012; Dunstan et al., 1993) แสดงให้เห็นว่าไดอะตอมมีศักยภาพที่สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ได้ดี อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ไดอะตอมและสภาวะการเจริญเติบโตหรือสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ไดอะตอมมีความสามารถในการสร้างสารดังกล่าวข้างต้นได้แตกต่างกันทั้งในรูปของชนิดและปริมาณของสารเมแทบอไลต์ (Ying et al., 2002; Dolch and Maréchal, 2015)

ไดอะตอมท้องน้ำ (benthic diatom) มักอาศัยอยู่เกาะกับวัตถุต่างๆ ในมวลน้ำ เช่น กิ่งไม้ ก้อนหินและผิวหน้าดินตะกอนที่แสงส่องถึงได้ และเป็นอีกกลุ่มที่น่าสนใจเพราะไดอะตอมกลุ่มนี้อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) ที่มีส่วนสำคัญสำหรับใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ (Ying et al., 2002) โดยทั่วไปไดอะตอมมีการเจริญเติบโตโดยสร้างอาหารเองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและตรึงสารประกอบอนินทรีย์คาร์บอนผ่านกระบวนการ Calvin-Benson cycle ซึ่งเป็นสภาวะการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟิก (autotrophic growth) และบางชนิดยังเจริญเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic growth) โดยการดูดซึม (assimilation) สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนในที่มืด โดยเซลล์นำสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ ทั้งนี้พบลักษณะการเจริญเติบโตแบบนี้ในสาหร่ายเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น และไดอะตอมท้องน้ำเป็นหนึ่งในชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะ

เฮเทอโรโทรฟิก (Lowrey et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีเซลล์อาจเจริญเติบโตในภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารอินทรีย์ร่วมด้วยจึงเป็นการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกร่วมกับสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก เรียกว่ามิกโซโทรฟิก (mixotrophic growth) (Chen and Zhang, 1997) เห็นได้ว่าแต่ละสภาวะการเจริญเติบโตที่กล่าวมาข้างต้นมีแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ส่งผลให้มีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกันด้วย (Lowrey et al., 2015) ในหลายงานวิจัยจึงพบว่าการสร้างสารประกอบทางชีวเคมีของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจะมีปริมาณและชนิดต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญเติบโตหรือสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำไดอะตอมท้องน้ำ *Nitzschia* sp. BUU1501 ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำจากฟาร์มกุ้งขาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (พงษธร, 2558) มาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก ติดตามการเจริญเติบโตของไดอะตอมเพื่อทราบถึงแนวทางการเพาะเลี้ยงไดอะตอมดังกล่าวให้ได้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีการศึกษา

หัวข้อไดอะตอมที่ใช้ในการทดลอง

ไดอะตอมได้จากงานวิจัยของ พงษธร (2558) ที่ได้เก็บตัวอย่างไดอะตอมท้องน้ำโดยขูดเก็บเมือกที่เกาะอยู่บนก้อนหิน หน้าดินและกิ่งไม้ในบ่อพักน้ำจากฟาร์มกุ้งขาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี บ่อพักน้ำดังกล่าวมีความเค็ม 8.67 ± 1.16 ppt พีเอช 2.88 ± 0.02 ปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรต ฟอสเฟตและซิลิเกตเท่ากับ 0.87 ± 0.00 , 0.83 ± 0.09 0.01 ± 0.01 และ 1.62 ± 0.13 มก./ล. ตามลำดับ และจากการจำแนกชนิดไดอะตอมพบว่าเป็นไดอะตอมท้องน้ำชนิด *Nitzschia* sp. BUU1501 ลักษณะเซลล์ไดอะตอมดังกล่าวแสดงดัง Figure 1A-B

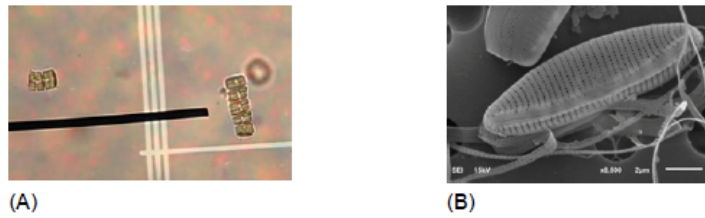


Figure 1 Morphology of *Nitzschia* sp. BUU1501 under light microscope (A) and electron microscope (B)

การเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิก และเฮเทอโรโทรฟิกของไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUUC1501

ทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารปริมาตร 90 มล. เติมหิวเชื้อไดอะตอมปริมาตร 10 มล. ทั้งนี้สภาวะการเจริญเติบโตของไดอะตอมที่ใช้ในการทดลองมี 3 สภาวะ แต่ละสภาวะทดลอง 3 ซ้ำ ดังนี้

(1) สภาวะการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟิกโดยเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารสูตรของกิลลาร์ด หรือ F/2 (Guillard, 1973) อาหารดังกล่าวเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ วางขวดเลี้ยงไดอะตอมในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอดเวลาด้วยความเข้มแสง 4,300 ลักซ์

(2) สภาวะการเจริญเติบโตแบบมิกโซโทรฟิกจะเพาะเลี้ยงไดอะตอมในอาหารสูตร F/2 ผสมอาหารสูตร Nutrient broth (NB medium) ที่มีส่วนประกอบของเปปโตเน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดในปริมาณ 5, 2 และ 1 ก./ล. ตามลำดับ (Bridson, 1995) และเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในรูปสารอินทรีย์ 10 ก./ล. (ชมพูนุท และคณะ, 2544) วางขวดเพาะเลี้ยงไดอะตอมในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิและให้แสงตลอดเวลาเช่นเดียวกับสภาวะแบบออโตโทรฟิก

(3) สภาวะการเจริญเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิกเป็นการเพาะเลี้ยงไดอะตอมในอาหารสูตรเดียวกับสภาวะมิกโซโทรฟิก แต่วางขวดเลี้ยงไดอะตอมในที่มืดและอุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส

ในระหว่างการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมนาน 8 วัน ได้ติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับเซลล์บน

สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) จากนั้นคำนวณหาความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์/มล.) และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของไดอะตอม (μ) รายงานในหน่วยต่อวัน ด้วยสมการโดยที่ N_1 คือ ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์/มล.) ณ เวลา t_1 (วัน) และ N_2 คือ ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์/มล.) ณ เวลา t_2 (วัน) และคำนวณหาผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอม (เซลล์/ล./วัน) ตามสมการ N_1 คือ ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น (เซลล์/มล.) ณ วันแรกของการทดลอง หรือ t_1 (วัน) และ N_2 คือ ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์/ล.) ณ วันที่ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด หรือ t_2 (วัน)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอมที่มีสภาวะการเจริญเติบโตแตกต่างกันด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรมใช้โปรแกรม R version 3.3.1

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ไดอะตอมที่เลี้ยง *Nitzschia* sp. มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) ที่มีประมาณ 16.55 และ 1.69% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Courtois de Viçose et al., 2012) ทั้งนี้สัตว์และมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันชนิดดังกล่าวได้ ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

วัยอ่อน เช่น กุ้งและหอย จึงต้องให้อาหารที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอด (Sargent et al. 1999) ไดอะตอมจึงมีศักยภาพใช้เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟิค มิกโซโทรฟิคและเฮเทอโรโทรฟิค นาน 8 วัน พบว่าไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUU1501 สามารถเติบโตได้ทั้ง 3 สภาวะ และเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ทันทีโดยไม่พบว่ามีเซลล์อยู่ในระยะพัก (lag growth phase) การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคที่เซลล์สร้างอาหารเองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานจึงมีสภาวะการเจริญเติบโตเหมือนกับพืชทั่วไป และให้เซลล์สูงสุดได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน โดยให้เซลล์สูงสุด 185.46x10⁴ เซลล์/มล. ในขณะที่ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิคและเฮเทอโรโทรฟิคใช้เวลาเร็วกว่าโดยใช้เวลาเพียง 4 และ 3 วัน ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะมิกโซโทรฟิคและเฮเทอโรโทรฟิคมีสารอินทรีย์คาร์บอนในรูปของกลูโคสที่เซลล์สามารถดูดซึมไปใช้ได้โดยตรงผ่านกระบวนการ assimilation (Lowrey et al., 2015; Li et al., 2014) เซลล์จึงเจริญเติบโตได้เร็วและให้เซลล์สูงสุด 147.47 และ 37.78x10⁴ เซลล์/มล. ตามลำดับ แต่เห็นได้ว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิคและเฮเทอโรโทรฟิคมีเซลล์สูงสุดต่ำกว่าสภาวะออโตโทรฟิค ทั้งนี้อาจเนื่องจากชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์คาร์บอนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ กลูโคส 10 ก./ล. คิดเป็น 4 ก.คาร์บอน/ล. อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไดอะตอมชนิดนี้ แต่ Li et al. (2014) กลับพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่เจริญเติบโตแบบมิกโซโทรฟิคในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 4 ก.คาร์บอน/ล. เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิคมากถึง 5.4 เท่า ทั้งนี้ชนิดของสารอินทรีย์คาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบมิกโซโทรฟิคและเฮเทอโรโทรฟิ

คั้นนั้นมีหลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล อะซิเตตและน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์คาร์บอนสูง เป็นต้น (Shishlyannikov et al., 2014; Lowrey et al., 2015)

การที่เซลล์ไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าสภาวะมิกโซโทรฟิค (Figure 2 และ Table 1) อาจเป็นเพราะสภาวะมิกโซโทรฟิคเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเนื่องจากกระบวนการเพาะเลี้ยงมีการให้แสงตลอดเวลา และเซลล์ยังสามารถดูดซึมกลูโคสมาใช้ในการเจริญเติบโตร่วมด้วยเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมกลูโคส (Shishlyannikov et al., 2014) ในขณะที่สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืด เซลล์เจริญเติบโตได้โดยอาศัยกระบวนการดูดซึมกลูโคสเพียงอย่างเดียวเท่านั้น อีกสาเหตุหนึ่งซึ่งส่งผลให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคเจริญเติบโตต่ำกว่าสภาวะออโตโทรฟิคและมิกโซโทรฟิค คือ การเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิคมักเกิดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย โดยหากเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียจะพบว่าแบคทีเรียสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่สาหร่ายมีการเติบโตได้ช้ากว่าแบคทีเรียมาก (Chen, 1996))

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUU1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงใน Table 1 พบว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคและมิกโซโทรฟิคส่งเสริมเซลล์ให้เจริญเติบโตได้ดีใกล้เคียงกันและให้เซลล์สูงสุดได้สูงกว่าสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเช่นเดียวกัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิคมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสภาวะออโตโทรฟิค ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วยสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยสภาวะมิกโซโทรฟิคและออโตโทรฟิคให้ผลผลิตมวลชีวภาพมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยมีค่าสูงกว่าถึง

3.02 และ 3.00 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าไดอะตอมที่เจริญเติบโตแบบมิกโซโทรฟิคให้ผลผลิตได้ใกล้เคียงกับสภาวะออโตโทรฟิค แต่ต้นทุนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบมิกโซโทรฟิคสูงกว่าแบบออโตโทรฟิค เพราะต้องเติมสารอินทรีย์เพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแนวทางการลดต้นทุนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงไดอะตอมชนิดนี้ในสภาวะมิกโซโทรฟิคจึงอาจใช้

น้ำเสียที่มีสารอินทรีย์คาร์บอนเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เพราะโดยทั่วไปแล้วไดอะตอมสามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ เช่น น้ำเสียจากโรงงานผลิตภัณฑ์นม น้ำเสียจากบ้านเรือน น้ำเสียจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ปีก เป็นต้น (Shishlyanikov et al., 2014; Lowrey et al., 2015;)

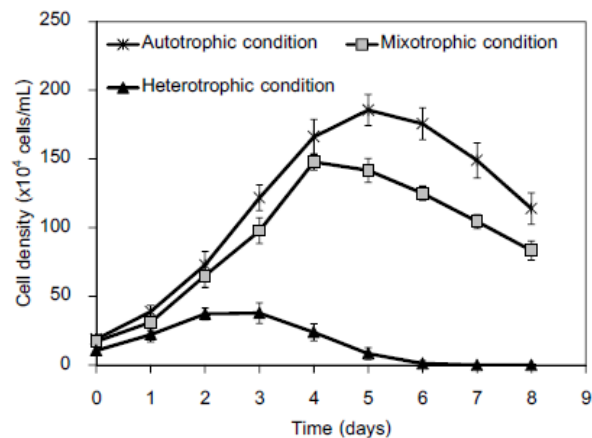


Figure 2 Growth of *Nitzschia* sp. BUU1501 under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions.

Table 1 Maximum specific growth, maximum cell density and biomass productivity of *Nitzschia* sp. BUU1501 under different growth conditions. Values showed mean \pm standard deviation of three replicate cultures. Different letters in column represent significant differences at $P \leq 0.05$.

| Growth condition | μ (day ⁻¹) | Maximum cell density (x10 ⁴ cells/mL) | Time to maximum cell density (day) | Biomass productivity (x10 ⁷ cells/L/day) |
|------------------|-------------------------------|---|---------------------------------------|--|
| Autotrophic | 0.55 \pm 0.04 ^{ab} | 185.46 \pm 8.57 ^a | 5 | 37.09 \pm 1.71 ^a |
| Mixotrophic | 0.65 \pm 0.10 ^a | 147.47 \pm 10.88 ^b | 4 | 36.87 \pm 2.72 ^a |
| Heterotrophic | 0.43 \pm 0.14 ^b | 37.78 \pm 7.53 ^c | 3 | 12.29 \pm 2.51 ^b |

สรุป

ไดอะตอมที่ใช้น้ำ *Nitzschia* sp. BUU1501 ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำจากฟาร์มกุ้งขาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค มิกโซโทรฟิคและเฮเทอโรโทรฟิค แต่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหากต้องการ

ผลผลิตเซลล์ไดอะตอมสูงควรเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคหรือมิกโซโทรฟิคก็ได้ เพราะทั้ง 2 สภาวะนี้ เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสภาวะเฮเทอโรโทรฟิค โดยเซลล์ให้ผลผลิตมวลชีวภาพ 37.09 \pm 1.71 และ 36.87 \pm 2.72 (x10⁷ เซลล์/ล./วัน.) หรือมีค่าสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคถึง 3.02 และ 3.00 เท่า ตามลำดับ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 42/2559

เอกสารอ้างอิง

- ชมพูนุท ชัยรัตน์ะ สรวิศ เม่าทองสุข และ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล. 2546. การเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ในที่มีศักยภาพได้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 25(2): 205-212.
- พงษ์ธร เจนจัดการ. 2558. การแยกและการเติบโตของสาหร่ายน้ำเค็มจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในบริเวณจังหวัดจันทบุรี. ปรินญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Armbrust, E.V. 2009. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*. 459: 185-192.
- Bridson, E. Y. 1995. *The Oxoid Manual*. 7ed. Unipath Limited, London.
- Chen, F., Y. Zhang, and S. Guo. 1996. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photobioreactor culture. *Biotechnology Letters*. 18(5): 603-608.
- Chen F., and Y. Zhang. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb Technol*. 20: 221-224.
- Courtois de Viçose, G., A. Porta, M. P. Viera, H. Fernández-Palacios, and M. S. Izquierdo. 2012. Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. *J Appl Phycol*. 24: 1427-1437.
- Dolch L-J. and E. Maréchal. 2015. Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs*. 13: 1317-1339.
- Dunstan, G.A., J.K. Volkman, S.M. Barrett, J-M. Leroi, and S.W. Jeffrey. 1993. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*. 35(1): 155-161.
- Guillard, R. R. L. 1973. Method for Microflagellates and Nanoplankton. In Stein, J. R. (ed). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University, New York.
- Li, Y-R., W-T. Tsai, Y-C. Hsu, M-Z., Xie, and J-J. Chen. 2014. Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energy Procedia*. 52: 371-376.
- Lowrey, J., M.S. Brooks, and P.J. McGinn. 2015. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review. *J Appl Phycol*. 27:1485-1498
- Sargent J., L. McEvoy, A. Estévez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson, and D. Tocher. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*. 179: 217-229.
- Shishlyannikov, S.M., I. V. Klimenkov, Y.D. Bedoshvili, I.S. Mikhailov, and A.G. Gorshkov. 2014. Effect of mixotrophic growth on the ultrastructure and fatty acid composition of the diatom *Synedra acus* from Lake Baikal. *J Biol Res (Thessalon)*. 21(1): 15-21.
- Ying, H., M. Kang-sen, and S. Shi-chun. 2000. Total lipid and fatty acid composition of eight strains of marine diatoms. *Chin. J. Oceano. Limno*. 18(4): 345-349.

การเติบโตของไดอะตอมขนาดเล็ก *Amphora coffeaeformis*
 BUUC1601 ที่แยกจากปากแม่น้ำ จังหวัดจันทบุรี
 ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง

Growth of a small-sized diatom *Amphora coffeaeformis*
 BUUC1601 isolated from estuary, Chanthaburi Province,
 under batch and continuous cultivation

ปวีณา ตปนียวรวงศ์^{1,2*}, ณัฐชา พึงละอ³, ปาริชาติ ชุมทอง^{1,2}, มะลิวัลย์ คูตะโค³
 และ สรวิต เผ่าทองสุข^{1,2}

Paveena Tapaneeyaworawong^{1,2*}, Natchya Peungla-aw³, Parichat Chumtong²,
 Maliwan Kutako³ and Sorawit Powtongsook^{1,2}

บทคัดย่อ: การศึกษานี้ได้คัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้จากบริเวณปากแม่น้ำ ในจังหวัดจันทบุรี โดยใช้เทคนิค single cell isolation โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2 พบว่าคัดแยกได้ไดอะตอม *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ซึ่งเซลล์มีความยาว 33 ไมครอน จากการเพาะเลี้ยง *A. coffeaeformis* BUUC1601 แบบแบทช์ในขวดปริมาตร 1 ลิตร พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 220.44×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.54 ต่อวัน ส่วนการขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงเป็น 5 และ 10 ลิตร พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะลดลงเล็กน้อยเป็น 1.55 และ 1.24 ต่อวัน ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในขวดปริมาตร 2 ลิตรด้วยอัตราการเจือจางในช่วง 0.17-1.27 ต่อวัน พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องได้นานกว่า 50 วัน และที่อัตราการเจือจาง 1.27 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $57.39 \pm 7.21 \times 10^4 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อวัน ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุด 73.00×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อวัน
คำสำคัญ: ไดอะตอม, การคัดแยก, การเลี้ยงแบบแบทช์, การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง, ผลผลิตมวลชีวภาพ

ABSTRACT: In this study, the microalgae were isolated from estuary in Chantaburi Province using single cell isolation technique and culturing with F/2 culture medium. After isolation and molecular identification, the diatom *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 with the cell length of 33 microns was selected. Batch culture of *A. coffeaeformis* BUUC1601 in 1L bottle provided the maximum cell density of 220.44×10^4 cells/ml and specific growth rate of 2.54 per day. Scaling up the culture to 5 and 10 L slightly reduced specific growth rates to 1.55 and 1.24 per day, respectively. Continuous culture of *A. coffeaeformis* BUUC1601 in 2 L bioreactor with the dilution rate between 0.17-1.27 per day was accomplished for more than 50 days. With the dilution rate of 1.27 per day in continuous cultivation, average cell density of $57.39 \pm 7.21 \times 10^4 \times 10^4$ cell/ml/day and the maximum productivity of 73.00×10^7 cells/L/day were achieved.

Keywords: diatom, isolation, *Amphora coffeaeformis*, continuous culture, biomass productivity

¹ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
 National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency

² ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

³ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
 Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus

* Corresponding author: paveena.tap@biotec.or.th

บทนำ

สาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็กถูกนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน ไม่ว่าจะเป็นลูกกุ้ง ลูกปู ลูกปลา หรือแม้แต่หอยสองฝา สาหร่ายที่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารได้แก่ *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Isochrysis* และ *Nannochloropsis* โดยให้กับสัตว์น้ำโดยตรงหรือให้เป็นอาหารแพลงก์ตอนสัตว์ และนำแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหารแก่ลูกสัตว์น้ำอีกต่อหนึ่ง (Duerr, 1997) นอกจากนี้ประโยชน์ในการเป็นอาหารสำหรับอาหารสัตว์น้ำแล้ว สาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็กยังถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตน้ำมันเป็นพลังงานทางเลือก เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กก็ยังมีข้อได้เปรียบอยู่มากได้แก่ 1) สาหร่ายขนาดเล็กให้ผลผลิตน้ำมันต่อพื้นที่สูงกว่าพืชชนิดอื่น 2) สาหร่ายขนาดเล็กเติบโตในน้ำแต่ใช้น้ำน้อยกว่าพืชบก 3) สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำทะเล โดยไม่ต้องแย่งพื้นที่เพาะปลูกกับพืชชนิดอื่นๆ 4) สาหร่ายขนาดเล็กสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เปลี่ยนเป็นมวลชีวภาพได้ 5) สามารถใช้น้ำเสียหรือน้ำทิ้งมาเป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กได้ 6) สาหร่ายขนาดเล็กไม่จำเป็นต้องใช้ยาปราบศัตรูพืช 7) เศษสาหร่ายหลังจากการสกัดน้ำมันแล้วยังสามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ย หรือนำมาผลิตเป็นเอทานอล หรือมีเทนได้อีกด้วย และ 8) องค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายสามารถควบคุมได้จากการกำหนดสภาวะการเลี้ยง (Rodolfi et al., 2008)

จากความต้องการสาหร่ายสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติพิเศษ ได้แก่ สาหร่ายที่มีเซลล์ขนาดเล็กมาก มีคุณค่าทางอาหารสูง และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่ายด้วยการตกตะกอน ทำให้จำเป็นต้องทำการแยกสายพันธุ์สาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเป็นสาหร่ายกลุ่มเพนเนทไดอะตอม (pennate diatom) ที่มีขนาดเซลล์เล็กเพียง 5 ไมครอน ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะใช้เป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีขนาดเล็กมาก การใช้เป็นอาหารสำหรับตัวอ่อนหอยฝาเดียว และ

การเลือกไดอะตอมที่สามารถตกตะกอนได้เอง ทำให้การแยกผลผลิตไดอะตอมออกจากอาหารเพาะเชื้อทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่มีราคาแพง โดยในการวิจัยครั้งนี้ทำการแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำทะเลธรรมชาติในจังหวัดจันทบุรี มาทำการเพาะเลี้ยงในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์และต่อเนื่องในสภาวะห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินผลผลิตที่ได้จากระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

วิธีการศึกษา

สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณคลองปากน้ำ จังหวัดจันทบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนเตรต และฟอสเฟต (Strickland and Parsons, 1972) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.21, 0.14 และ 0.90 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและ 0.15 มล.ฟอสฟอรัสต่อลิตร ตามลำดับ และน้ำมีความเค็ม 31 พีเอสยู ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 4.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และ pH เท่ากับ 7.92

การแยกสาหร่ายขนาดเล็ก *Amphora coffeaeformis* BUUC1601

นำน้ำที่เก็บได้จากคลองปากน้ำ หมู่ 1 ตำบลกระแจะ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี (Latitude: 12.67043N, Longitude: 101.841369E) มาทำการกรองได้กัล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกเซลล์สาหร่ายให้ได้เซลล์เดี่ยวด้วยเทคนิค Single cell isolation จากนั้นนำเซลล์เดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 PSU (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) บ่มในสภาวะห้องปฏิบัติการที่ให้แสงตลอดเวลา (ประมาณ 1,000 ลักซ์) หลังจากนั้นทำมีความบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยการเขี่ย (streak) ลงบนอาหารแข็งสูตร F/2 เมื่อพบโคโลนีเดี่ยวและย้ายที่ลงในอาหารเหลว รอจนกระทั่งสาหร่ายเติบโตจึงเก็บเซลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง 12000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที นำตะกอนเซลล์มาสกัด DNA ตามวิธีที่ดัดแปลง

มาจาก Winnepeninckx (1993) จากนั้นเพิ่มขึ้นส่วน 18s RNA gene ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis และนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit จากนั้นทำการโคลนและสกัดพลาสมิดด้วย HiYield™ Plasmid Mini Kit แล้วทำการส่งวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดสาหร่าย

การเพาะเลี้ยง *Amphora coffeaformis* BUUC1601 ในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์

นำโคอะตอมขนาดเล็ก *A. coffeaformis* BUUC1601 ที่แยกได้จากบริเวณคลองปากน้ำ จังหวัดจันทบุรี มาทำการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในขวดแก้ว 1, 5 และ 10 ลิตร ด้วยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 5.67, 12.67 และ 8.90×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งสิ้น 3 ข้างในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 (ความเค็ม 30 PSU) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงโคอะตอมภายในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 5,500 ลักซ์ ด้วยหลอด LED ตลอดเวลา เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้ตกตะกอนจึงต้องมีการกวนตลอดเวลา โดยใช้เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) ร่วมกับการให้อากาศตลอดเวลา และติดตามการเติบโตของด้วยการนับจำนวนด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน และคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะของโคอะตอมตามวิธีของ Becker (1994) วิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเติบโตจำเพาะของสาหร่าย ด้วยวิธี One-way Anova ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

การเพาะเลี้ยงโคอะตอม *Amphora coffeaformis* BUUC1601 แบบต่อเนื่อง

การศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงโคอะตอมขนาดเล็ก *A. coffeaformis* BUUC1601 ที่แยกได้จากธรรมชาติในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

เป็นการเลี้ยงที่มีการเติมอาหารให้กับสาหร่ายตลอดเวลาด้วยเครื่องสูบน้ำแบบรีดสาย (Masterflex C/L model 77120-62) ที่จะทำหน้าที่ควบคุมอัตราการไหลเข้าของอาหารเพาะเชื้อ ในขณะที่เดียวกันผลผลิตจะไหลออกทางท่อด้านบนด้วยแรงดันอากาศเข้าขวดเก็บผลผลิต ก่อนทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะทำการเลี้ยงสาหร่ายแบบแบทช์ในขวดแก้วขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 3-4 วัน จนสาหร่ายเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณคือสาหร่ายมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น จึงทำการเริ่มการเลี้ยงสาหร่ายในขวดแก้วขนาด 2 ลิตรแบบต่อเนื่อง โดยเริ่มเติมอาหารด้วยอัตราการเจือจาง 0.2 ต่อวัน เมื่อความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางคงที่จึงทำการปรับอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นเป็น 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.2 ต่อวัน ตามลำดับโดยอัตราการเจือจางคำนวณได้จาก $D = F/V$ โดยที่ D = อัตราการเจือจาง (ต่อวัน), F = อัตราการไหลของน้ำเลี้ยง (ลิตรต่อวัน) และ V = ปริมาตรการทำงานของถังเลี้ยง (ลิตร) (Bailey and Ollis, 1986) ในระหว่างการทดลองได้ติดตามการเติบโตของสาหร่ายด้วยการนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวัดปริมาณผลผลิตที่ได้เพื่อคำนวณอัตราการเติบโตทุกวัน วิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลผลิตของสาหร่าย ด้วยวิธี One-way Anova ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการศึกษา

การจำแนกชนิด

จากการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาทำการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาพบว่าเป็นสาหร่ายในกลุ่มโคอะตอมชนิด *Amphora coffeaformis* โดยให้ชื่อสายพันธุ์ BUUC1601 โคอะตอมนี้มีขนาดประมาณ 5 ไมครอน

การเติบโตของสาหร่าย *Amphora coffeaformis* BUUC1601 ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. coffeaformis* BUUC

1601 แบบแบทช์โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $5.67 \pm 1.33 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขวดแก้วปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 6 วัน พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.54 ต่อวัน (ในวันที่ 0-1 ของการเลี้ยง) มีความหนาแน่นสูงสุดถึง $220.44 \pm 53.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Figure 1) ในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ส่วนการทดลองเพิ่มปริมาตรการเพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดแก้ว 5 ล. เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $10.89 \pm 1.32 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จนในวันที่ 4 ของการเลี้ยง สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ $211.33 \pm 30.18 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด

เท่ากับ 1.55 ต่อวัน ในวันที่ 0-1 ของการเลี้ยง (Figure 1) และเมื่อทำการขยายปริมาตรการเลี้ยงเป็นปริมาตร 10 ลิตร เมื่อทำการเลี้ยงที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $7.62 \pm 2.98 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเติบโตเพิ่มจำนวนจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $166.67 \pm 10.10 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.24 ต่อวัน ในวันที่ 0-2 ของการเลี้ยง จากการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

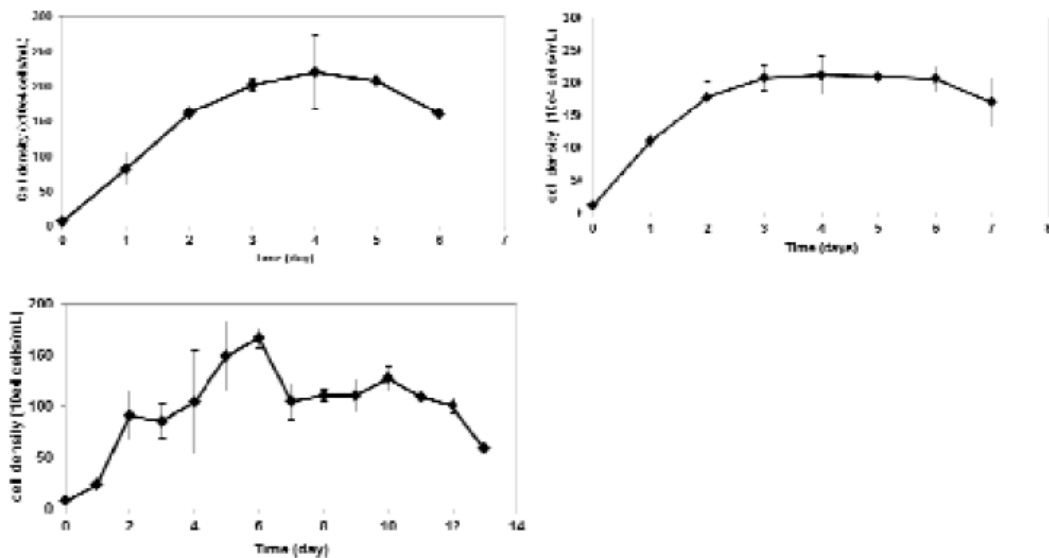


Figure 1 Growth of *A. coffeaeformis* BUUC1601 in 1 L (left), 5L (right) and 10L (bottom) bottles under batch culture condition.

การเติบโตของสาหร่าย *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

Figure 2 แสดงให้เห็นการเติบโตของสาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยเริ่มจากการเลี้ยงสาหร่ายแบบแบทช์เป็นเวลา 2 วัน จนสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์ $175.00 \pm 22.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร จึงเริ่มทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจาง 0.17 ± 0.03 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $186.21 \pm 28.17 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการปรับอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 0.44 ± 0.03 , 0.62 ± 0.02 , 0.83 ± 0.02 และ 1.27 ± 0.07 ต่อวัน ตามลำดับ พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย 117.44 ± 38.21 , 54.57 ± 7.77 , 49.17 ± 10.31 และ $57.39 \pm 7.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อคำนวณผลผลิตมวลชีวภาพพบว่าที่ระดับอัตราการเจือจาง 0.17 ± 0.03 , 0.44 ± 0.03 , 0.62 ± 0.02 , 0.83 ± 0.02 และ 1.27 ± 0.07 ต่อวัน มีผลผลิตมวลชีวภาพเท่ากับ 31.19, 51.33, 33.90, 40.69 และ 73.00×10^7 เซลล์ต่อลิตรวัน ตาม

ลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 50 วัน จากการทดสอบทางสถิติพบว่าที่ระดับอัตราการเจือจาง 1.27 ต่อวัน ให้ผลผลิตเซลล์สูงที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

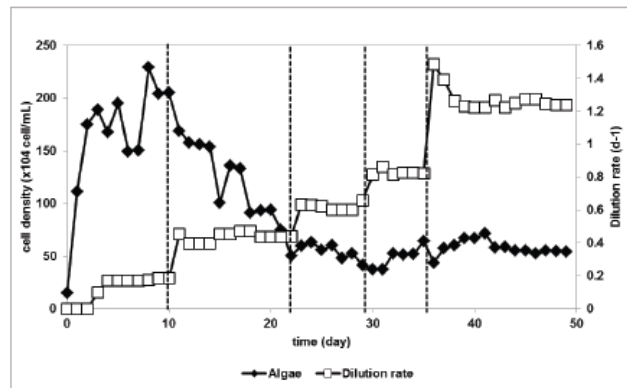


Figure 5 Growth of *A. coffeaeformis* BUUC1601 in 2 L bottle under continuous culture condition

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำในจังหวัดจันทบุรีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Single cell isolation แล้วทำการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุลพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้เป็นไดอะตอมชนิด *Amphora coffeaeformis* ผลการเลี้ยงไดอะตอมภายในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเพาะเลี้ยงสูตรกลลาร์ต F/2 พบว่า *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่เลี้ยงในระบบการเลี้ยงแบบเบทซ์ในขวดแก้วขนาด 1 ลิ. ให้ความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุด ($220.44 \pm 53.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, 2.54 ต่อวัน) เนื่องจากขวดแก้วขนาด 1 ลิตรสามารถรับแสงได้ดีกว่าในขวด 5 และ 10 ลิตร เนื่องจากแสงมีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายโดยปกติสาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีในช่วงแสง 5,000 – 10,000 ลักซ์ และเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเติบโตของไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 ทั้งที่เพาะเลี้ยงในขวดขนาด 1, 5 และ 10 ลิตร ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มีอัตราการเติบโตสูงกว่าการศึกษาของ Doan et

al. (2011) ที่ทำการศึกษการเติบโตของไดอะตอมที่เกาะอยู่บนสาหร่ายขนาดใหญ่ ในบริเวณชายฝั่งประเทศสิงคโปร์มาทำการเพาะเลี้ยงแบบเบทซ์ด้วยอาหารสูตรกลลาร์ต F/2 พบว่าเป็นไดอะตอม *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* sp. และ *Chaetoceros* sp. และมีอัตราการเติบโตเท่ากับ 0.95, 0.61 และ 0.87 ต่อวัน และเมื่อเปรียบเทียบกับเบนทิกไดอะตอมในการศึกษาของ Yang et al. (2014) พบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของ *Navicula patrickae*, *Nitzschia panduriformis*, *Navicula thienemannii*, *Nitzschia longissima* และ *Navicula atomus* มีค่าเท่ากับ 0.17, 0.18, 0.07, 0.27 และ 0.13 ต่อวัน แสดงให้เห็นว่าไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่เป็นไดอะตอมในบริเวณปากแม่น้ำที่ไหลลงสู่อ่าวไทย บริเวณจังหวัดจันทบุรี มีศักยภาพที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อมวลชีวภาพไปใช้ประโยชน์ได้เพราะมีการเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC1601 ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางตั้งแต่ 0.17 ± 0.03 จนถึง 1.27 ± 0.07 ต่อวัน พบว่าเมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น

ความหนาแน่นเซลล์จะลดลงซึ่งเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ออกจากระบบ (washout) (Shozen et al., 2001) แต่จากการวิจัยในครั้งนี้ถึงแม้ว่าจะเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 1.28 ต่อวัน ก็ยังไม่พบสภาวะการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ และยังให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงสุดที่อัตราเจือจาง 1.27 ต่อวัน โดยการเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเลี้ยงที่มีการเติมอาหารเพาะเชื้อให้กับสาหร่ายอย่างต่อเนื่อง ทำให้สาหร่ายเติบโตได้ตลอดเวลา อีกทั้งการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแบบต่อเนื่องให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงแบบแบทช์ (James and Al-Khars, 1990) นอกจากนี้ให้ผลผลิตที่สูงแล้วการเลี้ยงแบบต่อเนื่องยังสามารถสร้างเป็นระบบอัตโนมัติทำให้ลดการใช้แรงงานลงได้และยังให้สาหร่ายคงที่ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เนื่องจากควมสภาวะที่ใช้ในการเติบโตได้ (Marchetti et al., 2012)

ไดอะตอมถือได้ว่าเป็นแหล่งของสารประกอบทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูง จึงมีหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเพื่อเป็นแหล่งของกรดไขมัน เช่น Wen and Chen (2002) ได้เพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia laevis* แบบต่อเนื่องเพื่อผลิตกรดไขมัน EPA (*Eicosapentaenoic Acid*) พบว่าการเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia laevis* ที่อัตราการเจือจาง 0.5 ต่อวัน และใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดไขมัน EPA สูงสุด ส่วนไดอะตอม *Amphora subcutiuscuba* สามารถผลิต EPA ได้สูงถึง 11.9-19.0% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Wah et al., 2015) จึงชี้ให้เห็นว่าไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 อาจใช้เป็นแหล่งผลิต EPA ได้ นอกจากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมขนาดเล็กเพื่อใช้ผลิตสารมูลค่าสูงหรือเพื่อผลิตพลังงานทางเล็อกแล้ว ไดอะตอมยังมีประโยชน์ในการเป็นอาหารสำหรับลูกสัตว์น้ำขนาดเล็กอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis discus* ซึ่ง Gordon et al. (2006) โดยใช้ไดอะตอม *Navicula cf. lenzii* และ *Amphora lucia* ร่วมกันในการอนุบาลลูกหอยเป๋าฮื้อในระยะลงเกาะพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดได้ถึงร้อยละ 50 อัตราการสร้างเปลือก 36 ไมครอนต่อวัน และมีขนาด 1.4 มม. ใน 30 วันหลังลงเกาะ

สรุป

จากการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากบริเวณปากแม่น้ำ จังหวัดจันทบุรี จำแนกได้เป็นไดอะตอม *Amphora* sp. BUUC1601 และสามารถเพาะเลี้ยงไดอะตอมได้ผลดีภายในสภาวะห้องปฏิบัติการทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง โดยในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในขวดแก้ว 1 ลิตร มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.54 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $220.44 \pm 53.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวด 5 ลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องพบว่าที่อัตราการเจือจาง 1.27 ต่อวัน สามารถให้ผลผลิตไดอะตอมได้ดีที่สุดโดยมีผลผลิตสูงสุด 77.00×10^7 เซลล์ต่อลิตรต่อวัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 42/2559

เอกสารอ้างอิง

- Abu-Rezq, T. S. J. Al-Shimmari, and P. Dias. 1997. Live food production using batch culture and chemostat system in Kuwait. *Hydrobiologia*. 358: 173-178.
- Bailey, J. E., and D. F. Oillis. 1986. *Biochemical Engineering Fundamental*. McGraw-Hill. Singapore.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, UK.
- Doan, T. T. Y., B. Sivaloganathan, and J. P. Obbard. 2011. Screening of marine microalgae for biodiesel feedback. *Biomass and Bioenergy*. 35: 2534-2544.
- Duerr, E. O., A. Molnar, and V. Sato. 1998. Culture microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology*. 7: 65-70.
- Gordon, N., A. Neori, M. Shpigel, J. Lee, and S. Harpaz. 2006. Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture*. 252: 225-233.

- Guillard, R.R.L. 1973. Method for Microflagellates and Nanoplankton. In J.R. Stein (Ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, UK.
- James, C. M., and A. M. Al-Khars. 1990. An intensive continuous culture system using tubular photoreactors for producing microalgae. *Aquaculture*. 87: 381-393.
- Marchetti, J., G. Bougaran, L. Le Dean, C. Megrier, E. Lukomska, R. Kass, E. Olivo, R. Baron, R. Robert, and J. P. Cadoret. 2012. Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*. 326-329: 106-115.
- Ramirez, E. E., M. A. Gonzalez, A. S. Cifuentes, I. Inostroza, and R. E. Urrutia. 2015. Culture and growth of two benthic diatoms species isolated from the Salar Del Huasco (North of Chile, 20°S) at different conditions of temperature, light and nutrient. *Gayana Botany*. 72(2): 165-176.
- Rodolfi, L., G. C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, and M. R. Tredici. 2008. Microalgae for oil: Selection, introduction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*. 102: 100-112.
- Shozen, K., I. Umeda, T. Nakashima, and A. Honma. 2001. Continuous cultivation of a diatom, *Chaetoceros ceratosporum*, in deep-sea water pumped from Toyama Bay. *IOA Newsletter*. 12(4).
- Strickland, J.D.H., and T. R. Parson. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Research of board of Canada, Canada.
- Wah, N. B., A. L. Ahmad, D. C. Juinn, D. C. J. Chieh, and A. T. S. Hwai. 2015. Changes in lipid profiles of a tropical benthic diatom in different cultivation temperature. *Asian Journal of Applied Science and Engineering*. 4(20): 91-101.
- Wen, Z. Y., and F. Chen. 2002. Continuous cultivation of the Diatom *Nitzschia laevis* for Eicosapentaenoic Acid Production: physiological study and process optimization. *Biotechnology Progress*. 18: 21-28.
- Winnepeninckx, B., T. Backeljau, and R. Wacquier. 1993. Extraction of High Molecular Weight DNA from Molluscs. *Trends Genetics*. 9: 40.
- Yang, M. W. Zhao, and X. Xie. 2014. Effect of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms. *Acta Ecologica Sinica*. 34: 311-319.

การคัดแยกไดอะตอมขนาดใหญ่จากบ่อพักน้ำของฟาร์มเลี้ยงกุ้ง และการเพาะเลี้ยงในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง

Isolation of large diatom from shrimp farm reservoir and cultivation under batch and continuous modes

ปวีณา ตปนีย์วรวงษ์^{1,2*}, เฟื่องฟ้า เสรมีไหม³, ปรรธนา ปานทอง^{1,2}, มะลิวัลย์ กุตะโก³,
 วิชญา กันบัว⁴ และ สรวิต เผ่าทองสุข^{1,2}

Paveena Tapaneeyaworawong^{1,2*}, Fuengfa Sermmai³, Prarathana Pantong^{1,2},
 Maliwan Kutako³, Vichaya Gunbua⁴ and Sorawit Powtongsook^{1,2}

บทคัดย่อ: การศึกษานี้ได้คัดแยกและเพาะเลี้ยงไดอะตอมที่เซลล์มีขนาดใหญ่จากบ่อพักน้ำของฟาร์มเลี้ยงกุ้งในจังหวัดจันทบุรี ซึ่งตั้งอยู่ในภาคตะวันออกของประเทศไทย ทำการคัดแยกไดอะตอมด้วยเทคนิค single cell isolation โดยใช้อาหารสูตร F/2พบว่าคัดแยกได้ไดอะตอม *Navicula* sp. BUUC1501 ซึ่งเซลล์มีความยาว 40 ไมครอน และสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการตกตะกอน จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Navicula* sp. BUUC1501 แบบแบทช์ในช่วง 1 ล. พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 129.17×10^4 เซลล์/มล. และอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.99 ต่อวัน ส่วนการขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงเป็น 5 ล. พบว่าไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะลดลงเพียงเล็กน้อยเป็น 0.84 ต่อวัน และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 129.39×10^4 เซลล์/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในช่วงปริมาตร 2 ล. ด้วยอัตราการเจือจางในช่วง 0.2-0.6 ต่อวัน พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องได้นานกว่า 40 วัน และที่อัตราการเจือจาง 0.22 ต่อวัน ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $183.92 \pm 44.16 \times 10^4$ เซลล์/มล. และให้ผลผลิตมวลชีวภาพเท่ากับ 40.74×10^7 เซลล์/ล./วัน การเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.4 ต่อวัน กลับส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลงเป็น $141.75 \pm 17.10 \times 10^4$ เซลล์/มล. ผลการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องแสดงให้เห็นว่าไดอะตอมให้ผลผลิตเซลล์สูงสุด 87.15×10^7 เซลล์/ล./วัน เมื่อใช้อัตราการเจือจาง 0.58 ต่อวัน ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $150.00 \pm 25.74 \times 10^4$ เซลล์/มล.

คำสำคัญ: ไดอะตอม, การแยกเชื้อบริสุทธิ์, ผลผลิตมวลชีวภาพ, การเลี้ยงแบบแบทช์, การเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

¹ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
 National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency

² ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

³ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
 Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chantaburi Campus

⁴ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
 Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University

* Corresponding author: paveena.tap@biotec.or.th

ABSTRACT: This study involved the isolation and cultivation of large diatom from shrimp farm reservoir in Chantaburi Province, Eastern Thailand. Isolation was performed by single cell isolation technique using F/2 medium and the diatom was identified as *Navicula* sp. BUUC1501. The *Navicula* sp. BUUC1501 was 40 microns in length and cells could be harvested from the culture medium by sedimentation. Under batch culture condition, maximum cells density of *Navicula* sp. BUUC1501 in 1L culture bottles were 129.17×10^4 cells/ml with specific growth rate of 0.99 /day. Scaling up the culture to 5 L culture bottles slightly reduced the specific growth rate to 0.84 /day with the maximum cells density 129.39×10^4 cells/ml. Finally, continuous culture of *Navicula* sp. BUUC1501 was performed in 2 L culture bottle with the dilution rate between 0.2-0.6 /day. It was found that *Navicula* sp. was successfully cultured under continuous mode for more than 40 days. At the dilution rate of 0.22 /day, the diatom density was $183.92 \pm 44.16 \times 10^4$ cells/ml and the biomass productivity of 40.74×10^7 cells/L/day. Increasing of the dilution rate to 0.4 /day decreased the cells density to $141.75 \pm 17.10 \times 10^4$ cells/ml. With continuous culture, the highest cell productivity of 87.15×10^7 cells/L/day was obtained from the dilution rate of 0.58 /day which provided the cells density of $150.00 \pm 25.74 \times 10^4$ cells/ml.

Keywords: diatom, isolation, biomass productivity, batch culture, continuous culture

บทนำ

ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวปริมาณมาก ก็คือการเก็บผลผลิตสาหร่าย เนื่องจากเซลล์ของสาหร่ายมักมีขนาดเล็กไม่สามารถเก็บโดยการกรองได้ การผลิตสาหร่ายเซลล์เดียวในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ซึ่งมีราคาแพงมาก การค้นหาสายพันธุ์สาหร่ายที่จะสามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมากโดยสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่ายจึงมีความจำเป็น

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เช่น กุ้งขาวและปลากะพง เกษตรกรจะสูบน้ำเค็มธรรมชาติน้ำนำมาพักไว้บ่อพักเพื่อเตรียมน้ำก่อนนำเข้าสู่บ่อเลี้ยงจึงสามารถพบสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เติบโตอยู่ได้ เช่น *Oscillatoria*, *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Nitzschia*, *Navicula* และ *Cymbella* (Sen and Sonmez, 2006) ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กดังกล่าวโดยเฉพาะในกลุ่มของไดอะตอม (diatom) จะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเพราะอุดมไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเติบโตและพัฒนาการของสัตว์น้ำวัยอ่อนอีกด้วย (Natrah et al., 2007) จึงทำให้ไดอะตอมมีบทบาทสำคัญในด้านการเป็นอาหารสำหรับลูกสัตว์น้ำของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน, ลูกปลา และใช้ในการเพาะเลี้ยงหอยสองฝาในหลายๆ ระยะเวลา รวมถึงใช้เป็นอาหารสำหรับแพลงก์ตอนสัตว์ซึ่งจะถูกนำไปใช้

เป็นอาหารเมื่อลูกสัตว์น้ำโตขึ้น (Volkman et al., 1989) ทั้งนี้หากสามารถเพาะเลี้ยงไดอะตอมที่มีอยู่ในน้ำเค็มเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ในข้างต้นจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างคุ้มค่าเนื่องจากในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมดังกล่าวด้วยน้ำเค็มธรรมชาติได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้แยกไดอะตอมน้ำเค็มจากบ่อพักน้ำในฟาร์มกุ้ง จังหวัดจันทบุรี โดยเน้นไดอะตอมที่มีเซลล์ขนาดใหญ่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ด้วยวิธีการทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำมาศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอม โดยเพาะเลี้ยงทั้งแบบแบทช์ (batch culture) และต่อเนื่อง (continuous culture) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงไดอะตอมที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็มเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำโดยกรองผ่านถุงลากลากแพลงก์ตอนและเก็บตัวอย่างไดอะตอมที่เติบโตเกาะติดเป็นเมือกที่ปกคลุมผิวน้ำดินและก้อนหินภายในบ่อพักน้ำขนาด 2 ไร่ จากฟาร์มเลี้ยงกุ้ง อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี และตรวจวัดพารามิเตอร์ต่างๆ ประกอบด้วยปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนเตรต ฟอสเฟตและ

ซิลิเกต (Strickland and Parsons, 1972) โดยมีค่าเท่ากับ 0.84 มล.ไนโตรเจน/ล., 0.07มล.ไนโตรเจน/ล., 0.83มล.ไนโตรเจน/ล., 0.01 มล.ฟอสฟอรัส/ล. และ 1.62 มล.ซิลิเกต/ล. ตามลำดับ และวัดค่าการละลายออกซิเจนด้วย DO meter ((รุ่น DO 200, YSI INC) มีค่าเท่ากับ 6.42 มล.ก./ล. ตรวจวัดค่า pH ด้วย pH meter (รุ่น CONSORT C532x, CONSORT) มีค่าเท่ากับ 2.88

การแยกไดอะตอม

นำน้ำที่เก็บได้จากบ่อพักน้ำมาทำการส่งใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกเซลล์ไดอะตอมให้ได้เซลล์เดี่ยวด้วยเทคนิค Single cell isolation จากนั้นนำเซลล์เดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) บ่มในสภาวะห้องปฏิบัติการที่แสงตลอดเวลา (ประมาณ 1000 ลักซ์) แยกเซลล์ไดอะตอมให้มีความบริสุทธิ์โดยนำไดอะตอมในอาหารเพาะเชื้อมาเชื้อ (streak) ลงบนอาหารแข็งสูตรกิลลาร์ด F/2 ที่มีวุ้น 1.5 % นำไปบ่มจนกระทั่งพบว่าไดอะตอมเติบโตจึงเลือกโคโลนีเดี่ยวและย้ายที่ลงในอาหารเหลวจนกระทั่งไดอะตอมเติบโตจึงจำแนกสกุลโดยตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีของ ลัดดา, 2542

การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบทช์

นำไดอะตอม *Navicula* ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำในฟาร์มกุ้งมาเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในขวดแก้วปริมาตร 1 และ 5 ล. ตามลำดับ โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรกิลลาร์ด F/2 (เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 3,000 ลักซ์ ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา เนื่องจากไดอะตอมชนิดนี้มีขนาดเซลล์

ใหญ่และตกตะกอนจึงต้องมีการกวนตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) ร่วมกับการให้อากาศตลอดเวลา และทำการติดตามการเติบโตของไดอะตอมด้วยการนับจำนวนด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน และคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอมตามวิธีของ Becker (1994) โดยทำการสุ่มนับทั้งสิ้นตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่อง

การศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Navicula* ในแบบต่อเนื่อง (Continuous culture) โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับแบบแบทช์ แต่ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะใช้เครื่องสูบน้ำแบบปริตสาย (Masterflex C/L model 77120-62) เพื่อควบคุมอัตราการไหลของอาหารที่สูบน้ำจากถังเก็บอาหารเข้าสู่ขวดเพาะเลี้ยงไดอะตอมตลอดเวลา ในขณะที่เดียวกันผลผลิตของไดอะตอมที่ได้ในขวดเพาะเลี้ยงก็จะไหลออกทางท่อด้านบนด้วยแรงดันอากาศภายในขวดเข้าสู่ขวดเก็บเกี่ยวผลผลิตไดอะตอม การทดลองเริ่มต้นจากเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Navicula* แบบแบทช์ในขวดแก้วปริมาตร 2 ล. นาน 4 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ชุดทดลอง เมื่อให้ไดอะตอมเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณ จากนั้นจึงเริ่มเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางประมาณ 0.2 ต่อวัน โดยอัตราการเจือจางคำนวณได้จาก $D=F/V$ โดยที่ D = อัตราการเจือจาง (ต่อวัน), F =อัตราการไหลของน้ำเลี้ยง (ล./วัน) และ V =ปริมาตรการทำงานของถังเลี้ยง (ล.) (Bailey and Oillis, 1986) เมื่ออัตราการเจือจางและความหนาแน่นเซลล์คงที่จึงทำการอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นเป็น 0.4, 0.5 และ 0.6 ต่อวัน ตามลำดับ ในระหว่างการทดลองได้ติดตามการเติบโตของไดอะตอมด้วยการนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยสุ่มนับตัวอย่างละ 3 ครั้งและวัดปริมาตรผลผลิตที่ได้เพื่อคำนวณอัตราการเติบโตทุกวัน

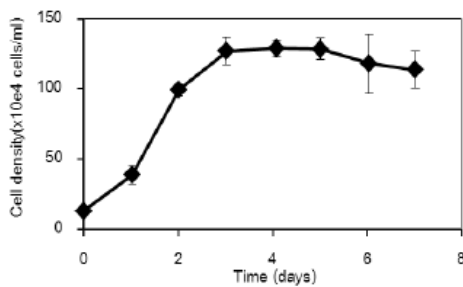
ผลการศึกษา

การแยกไดอะตอม

จากการคัดแยกไดอะตอมจากบ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง นำเซลล์ที่คัดเลือกได้มาจำแนกเบื้องต้นโดยการต้มเซลล์ในสารละลายกรดไนตริกและซัลฟูริกเข้มข้น นำเปลือกเซลล์ที่ผ่านการย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดแล้วมาส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นไดอะตอม *Navicula* sp. ที่มีขนาดความยาวประมาณ 40 ไมครอน ให้ชื่อว่า *Navicula* sp. BUUC1501

การเติบโตของไดอะตอม *Navicula* BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบทช์

การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Navicula* BUUC1501 แบบแบทช์โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $13.39 \pm 2.51 \times 10^4$ เซลล์/มล. ในขวดแก้วปริมาตร 1 ล.



เป็นเวลา 7 วัน พบว่าในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดถึง $129.17 \pm 6.03 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Figure 1) ทั้งนี้ไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.99 ต่อวัน (ในวันที่ 0-2 ของการเลี้ยง) ส่วนการทดลองเพิ่มปริมาตรการเพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดแก้ว 5 ล. เป็นเวลา 9 วัน โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $12.61 \pm 1.49 \times 10^4$ เซลล์/มล. จากนั้นพบว่าไดอะตอมมีการเติบโตและมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ $129.39 \pm 7.08 \times 10^4$ เซลล์/มล. ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง และมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.84 ต่อวัน ในวันที่ 0-2 ของการเลี้ยง (Figure 1) ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบทช์ด้วยปริมาตร 1 ล. จะเติบโตได้รวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตร 5 ล. แต่มีความหนาแน่นสูงสุดใกล้เคียงกัน

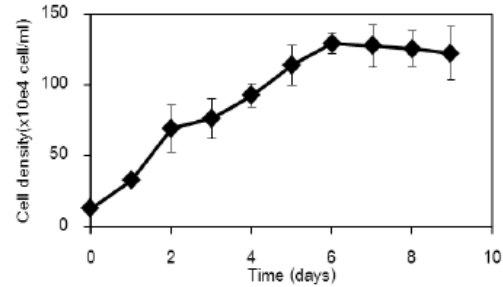


Figure 1 Growth of *Navicula* BUUC1501 in 1 L (left) and 5L (right) bottles under batch culture condition.

การเติบโตของไดอะตอม *Navicula* ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

Figure 2 แสดงให้เห็นการเติบโตของไดอะตอม *Navicula* BUUC1501 ที่แยกเชื้อได้จากบ่อพักน้ำในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 41 วัน โดยได้เลี้ยงแบบแบทช์ก่อนเป็นเวลา 4 วัน ซึ่งไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ $201.39 \pm 21.50 \times 10^4$ เซลล์/มล. จากนั้นในวันที่ 5-14 ของการเลี้ยง ได้รับเป็นการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยมีการเติมอาหารเข้าสู่ขวดเพาะเลี้ยงได

อะตอมด้วยอัตราการเจือจางเฉลี่ย 0.22 ± 0.02 ต่อวัน พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ $183.92 \pm 44.16 \times 10^4$ เซลล์/มล. เมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 0.40 ± 0.02 ต่อวัน ในระหว่างวันที่ 15-24 ของการเลี้ยง พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ $141.75 \pm 17.10 \times 10^4$ เซลล์/มล. หลังจากนั้นในวันที่ 25-41 ของการเลี้ยง การเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นอีกเป็น 0.58 ± 0.08 ต่อวัน ไดอะตอมมีความหนาแน่น $150.00 \pm 25.74 \times 10^4$ เซลล์/มล. เมื่อคำนวณผลผลิตเซลล์ที่อัตราการเจือจาง 0.22, 0.40 และ 0.58 ต่อวัน มีผลผลิต

เท่ากับ 40.67 ± 11.67 , 56.58 ± 5.23 และ $87.32 \pm 15.26 \times 10^7$ เซลล์/ล./วัน ตามลำดับ ผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าผลผลิตไดอะตอมเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ

ต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางที่สูงขึ้นเช่นกัน โดยที่อัตราการเจือจาง 0.58 ต่อวัน สามารถให้ผลผลิตมวลชีวภาพไดอะตอมได้สูงที่สุด

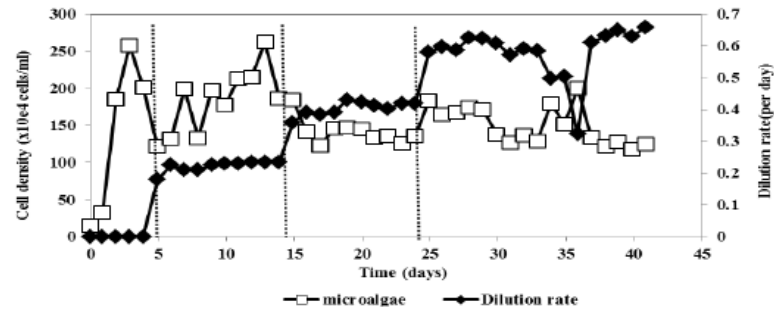


Figure 2 Growth of *Navicula* BUUC1501 in 2 L bottle under continuous culture condition

วิจารณ์

จากการจำแนกชนิดของไดอะตอมที่คัดแยกได้จากบ่อพักน้ำในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำพบว่า เป็นไดอะตอม *Navicula* sp. ซึ่งไดอะตอมชนิดนี้มีข้อดีคือสามารถเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตรมาตรฐาน (F/2) ในสภาวะห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Navicula* BUUC1501 แบบแบทช์ในขวดแก้วขนาด 1 ล. มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.99 ต่อวัน ในวันที่ 0-2 ของการเลี้ยง ซึ่งใกล้เคียงกับไดอะตอมชนิดที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคือ *Chaetoceros calcitrans* ซึ่งมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.00 ต่อวัน (ปวีณา, 2546) ซึ่งอัตราการเติบโตจำเพาะจะมีค่าแตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิด แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรการเพาะเลี้ยงเป็น 5 ลิตร กลับพบว่าอัตราการการเติบโตจำเพาะลดลงเล็กน้อยโดยมีค่าเท่ากับ 0.84 ต่อวัน ในวันที่ 0-2 ของการเลี้ยง ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยจำกัดเรื่องความเข้มแสงที่ส่องผ่านเข้าไปด้านในของขวดเลี้ยง เกิดการบังแสงกันเอง (self-shading) ของไดอะตอมในขวดที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้ไดอะตอมมีอัตราการสังเคราะห์แสงลดลง ทำให้อัตราการเติบโตลดลง อย่างไรก็ตาม แนวทางในการเพิ่มปริมาตรการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Navicula*

BUUC1501 แบบแบทช์เพื่อผลิตมวลชีวภาพมีความเป็นไปได้โดยอาจเพิ่มความเข้มแสงในระหว่างการเพาะเลี้ยง หรือปรับเปลี่ยนรูปแบบภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพการได้รับแสงมากขึ้น เช่นใช้ถังปฏิกรณ์ที่เป็นแบบแผ่นแบน (flat plate) ซึ่งจะช่วยให้แสงส่องผ่านได้ดีทำให้ไม่เกิดปัญหาเรื่องการบังแสงกันเองของเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง (Zhang and Richmond, 2003) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบทช์จะไม่มีการเติมอาหารเข้าเพิ่มเติมในระหว่างการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการเลี้ยงไประยะหนึ่งก็จะทำให้ปริมาณสารอาหารในน้ำลดลงจนหมดไป ส่งผลให้ไดอะตอมไม่สามารถเติบโตเพิ่มจำนวนต่อไปได้ ในขณะที่เมื่อปรับระบบการเลี้ยงเป็นแบบต่อเนื่อง จะช่วยลดปัญหาเรื่องการขาดสารอาหารของไดอะตอม (Bailey and Ollis, 1986) เมื่อเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานพบว่าไดอะตอมสามารถเติบโตได้ดี และการเพิ่มอัตราการเจือจางก็จะส่งผลต่อความหนาแน่นของเซลล์ที่เลี้ยง โดยการเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นจาก 0.22 เป็น 0.58 ต่อวัน ความหนาแน่นเซลล์ในสภาวะ steady stage จะลดลงจาก $183.92 \pm 44.16 \times 10^4$ เหลือ $150.00 \pm 25.74 \times 10^4$ เซลล์/มล. แสดงให้เห็นว่าเมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการ

ทดลองของ Shozen et al., (2001) ที่ทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Chaetoceros ceratosporum* ซึ่งการเพิ่มอัตราการเจริญที่สูงเกินไปจะทำให้สาหร่ายไม่สามารถเติบโตขึ้นมาทดแทนได้ทำให้เกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ (washout) ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าที่อัตราการเจริญ 0.58 ต่อวัน ไดอะตอมให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 87.15×10^7 เซลล์/ล./วัน แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจริญเท่ากับ 0.5-0.6 ต่อวัน เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงไดอะตอม *Navicula* BUUC1501 เป็นอัตราการเจริญที่ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุดและไม่เกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ ซึ่งผลการเติบโตนี้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Wen and Chen(2001) พบว่าอัตราการเจริญที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia laevis* มีค่าเท่ากับ 0.6 ต่อวัน แต่จากการศึกษาของมะลิวัลย์ และคณะ (2549) การเลี้ยงไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* ที่อัตราการเจริญ 0.98 ต่อวัน ให้ผลผลิตเซลล์สูงกว่า เนื่องจากได้ทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนที่เพิ่มประสิทธิภาพการรับแสงได้ดีกว่า ซึ่งส่งผลให้สาหร่ายเติบโตได้ดีที่ระดับอัตราการเจริญสูง

ไดอะตอม *Navicula* BUUC1501 ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำสามารถเติบโตได้ดีทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง และเซลล์มีขนาดใหญ่สามารถจมตัวลงสู่ก้นภาชนะได้ด้วยตัวเอง สามารถเก็บผลผลิตเซลล์ได้ง่ายต่างจากสาหร่ายเซลล์เดี่ยวทั่วไปที่มีขนาดเล็กทำให้ยากต่อการเก็บเกี่ยว (Sun et al., 2013) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไดอะตอมชนิดนี้มาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต นอกจากนี้ *Navicula* ชนิดนี้ยังแยกเลี้ยงได้จากน้ำในบ่อพักน้ำของฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2 ซึ่งเป็นสถานะที่ใกล้เคียงกับรายงานของ (DeNicola, 2000) ที่พบไดอะตอมในแหล่งน้ำที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 3.5 ทั้งนี้การที่สาหร่ายชนิดนี้สามารถเติบโตได้ในสถานะที่เป็นกรดจะเป็นข้อดีอย่างมากสำหรับการป้องกันการปนเปื้อนในระบบการเลี้ยงกลางแจ้งได้

สรุป

จากการคัดแยกไดอะตอมได้จากบ่อพักน้ำเค็มในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง จังหวัดจันทบุรี จำแนกได้เป็นไดอะตอม *Navicula* BUUC1501 โดยสามารถเพาะเลี้ยงได้ผลดีภายในสภาวะห้องปฏิบัติการทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง โดยในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในขวดแก้ว 1 ล. มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.99 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 129.17×10^4 เซลล์/มล. ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องพบว่าที่อัตราการเจริญ 0.58 ต่อวัน สามารถให้ผลผลิตไดอะตอมได้ดีที่สุดโดยมีผลผลิตสูงสุด 87.15×10^7 เซลล์/ล./วัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 42/2559

เอกสารอ้างอิง

- ปวีณาตปนิยวรรณศรี. 2546. การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.
- มะลิวัลย์ คุตะโค และ สรวิศ เผ่าทองสุข. 2549. ผลของอัตราการเจริญและความเข้มแสงต่อการเติบโตของไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงแผ่นแบน. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 28(5): 965-975.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Bailey, J. E., and D. F. Ollis. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd. McGraw-Hill. Singapore.
- Becker, E.W. 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, UK.

- Dahiya, A. 2015. *Bioenergy: Biomass to Biofuels*. Academic Press, UK.
- DeNicola, D.M. A review of diatoms found in highly acidic environments. 2000. *Hydrobiologia*. 433: 111-122.
- Guillard, R.R.L. 1973. Method for Microflagellates and Nanoplankton. In: J.R. Stein (Ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, UK.
- Natrah, F., F.M. Yosoff, M. Shariff, F. Abas, and N. S. Mariana. 2007. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *J. Appl. Phycol.* 10(1007): 10811.
- Sen, B., and F. Sonmez. 2006. A Study on the Algae in Fish Ponds and Their Seasonal Variations. *International Journal of Science & Technology*. 1(1): 25-33.
- Shozen, K., I. Umeda, T. Nakashima, and A. Honma. 2001. Continuous cultivation of a diatom, *Chaetoceros ceratosporum*, in deep-sea water pumped from toyama bay. *IOA Newsletter*. 12(4).
- Strickland, J.D.H., and T. R. Parson. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Research of board of Canada. Canada.
- Sun, X., C. Wang, Y. Tong, W. Wang, and J. Wei. 2013. A comparative study of microfiltration and ultrafiltration for algae harvesting. *Algal Research*. 2: 437-444.
- Volkman, J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers, and C.D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240.
- Wen, Z. Y., and F. Chen. 2001. A Perfusion-Cell breeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentaenoic acid *Nitzschia laevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 3163-22.
- Zhang, C. W., and A. Richmond. 2003. Sustainable, high-yielding outdoor mass cultures of *Chaetoceros muelleri* var. *subsalsum* and *Isochrysis galbana* in vertical plate reactors. *Mar Biotechnol.* 5(3): 302-10